

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Krista Vadi

**Maksa rakuvälise maatriksi komponentide muutuste iseloomustamine maksakahjustuse
korral**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad PhD Mariliis Klaas

MD, PhD Viljar Jaks

TARTU 2016

Maksa rakuvälise maatriksi komponentide muutuste iseloomustamine maksakahjustuse korral

Maksakahjustuse järgses maksa regeneratsioonis on oluline rakuvälise maatriksi (RVM) reorganiseerimine, kuid täpset RVMi rolli on vähe uuritud. Käesoleva töö eesmärgiks oli tuvastada akuutse maksakahjustuse korral tekkivad RVMi komponentide muutused ja nende mõju kahjustuse järgsele rakkude proliferatsioonile. Hiire maksa immunofluorestsentsanalüüsi abil tuvastati RVMi komponentide (fibronektiin, biglükään, vitronektiin, olfaktomediin-4, armadillo kordust sisaldav X-seoseline valk 2, elastiin ja IV tüüpi kollageen) ekspressioonitaseme ja lokalisatsiooni erinevused, mis viitasid rakkude migratsiooni ning elumuse reguleerimisele. Lisaks tuvastati RVMi komponentide esinemine proliferatsioonivõimeliste hepatotsüütide, tähtrakkude ja hematopoeetiliste rakkude lähistel, mis võib viidata RVMi soodustavale mõjule rakkude jagunemisele. Töö tulemused aitavad paremini mõista RVMi rolli maksakahjustuse järgses regeneratsioonis ja annavad täpsema ülevaate RVMi komponentidest, mis võivad soodustada rakkude proliferatsiooni.

Märksõnad: rakuväline maatriks, maksakahjustus, maksa regeneratsioon

CERCS: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Characterization of the changes in the extracellular matrix composition during liver damage

Remodelling of extracellular matrix (ECM) is necessary for liver regeneration following liver damage, but the precise role of ECM is not well studied. The aim of this study was to characterize the changes in ECM composition during acute liver damage and its impact on cell proliferation. Immunofluorescence analysis of mouse liver sections was used to identify the changes in the expression and localization of ECM constituents (fibronectin, biglycan, vitronectin, olfactomedin-4, armadillo repeat-containing X-linked protein 2, elastin and type IV collagen) which suggested that ECM can regulate cell migration and survival. Additionally, ECM constituents localized around proliferating hepatocytes, stellate cells and hematopoietic cells, indicating that ECM could potentially have a stimulating effect on cell division. The results of this study help to better understand the role of ECM in liver regeneration and offers a more precise overview of ECM constituents that could enhance cell proliferation.

Keywords: extracellular matrix, liver damage, liver regeneration

CERCS: B210 Histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Maks.....	6
1.1.1. Maks histoloogiline ehitus.....	7
1.1.2. Maks rakutüüpide tuvastamise markerid.....	8
1.2. Maks regeneratsioon.....	9
1.2.1. Maks homeostaatiline regeneratsioon	10
1.2.2. Maks regeneratsioon pärast partsiaalset hepatektoomiat.....	10
1.2.3. Maksakahjustuste uurimiseks kasutatavad katseloomad.....	11
1.2.4. Maks regeneratsioon pärast akuutset ja kroonilist maksakahjustust	11
1.3. RVM.....	14
1.3.1. RVMi põhikomponendid.....	16
1.3.2. RVMi regulatiivsed komponendid	18
1.4. Maks RVM ja regeneratsioon.....	19
1.4.1. Maks RVM	19
1.4.2. Muutused maksa RVMis maksakahjustuse järel.....	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	21
2.1. Töö eesmärgid.....	21
2.2. Materjalid ja meetodid	21
2.2.1. Katseloomad.....	21
2.2.2. Maksakahjustuse tekitamine ja koeproovide ettevalmistamine	22
2.2.3. Koelõikude lõikamine	22
2.2.4. Immunofluorestsentsanalüüsis kasutatud antikehad.....	22
2.2.5. Immunofluorestsentsanalüüs	24
2.2.6. Fluorestsentsmikroskoopia.....	25
2.3. Tulemused	25
2.3.1. RVMi ülesreguleeritud põhikomponendid: fibronektiin ja biglukaan	26
2.3.2. RVMi ülesreguleeritud regulatiivsed komponendid: vitronektiin, ARMCX2 ja OLFM4 ..	29
2.3.3. RVMi allareguleeritud põhikomponendid: elastiin ja IV tüüpi kollageen	35
2.4. Arutelu.....	38
KOKKUVÕTE	42
SUMMARY	43
KIRJANDUSE LOETELU.....	44
TÄNUAVALDUSED.....	52
LIHTLITSENTS.....	53
LISAD	54

KASUTATUD LÜHENDID

ARMCX – armadillo kordust sisaldav X-seoseline valk (ingl *armadillo repeat-containing X-linked protein*)

BEC – biliaarne epiteelirakk (ingl *biliary epithelial cell*)

CCl₄ – süsiniktetrakloriid (ingl *carbon tetrachloride*)

CDE dieet – koliini-defitsiitne dieet koos etioniini manustamisega (ingl *choline-deficient ethionine-supplemented diet*)

CK19 – tsütokeratiin-19 (ingl *cytokeratin-19*)

CYP2E1 – tsütokroom P450 2E1 (ingl *cytochrome P450 2E1*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenüülindool (ingl *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DDC – 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiin (ingl *3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine*)

GAG – glükosaminoglükaan

HNF4α – hepatotsüüdi tuumafaktor 4 alfa (ingl *hepatocyte nuclear factor 4 alfa*)

mAb – monoklonaalne antikeha (ingl *monoclonal antibody*)

MMP – matriksi metalloproteinaas (ingl *matrix metalloproteinase*)

MUP – peamine uriini valk (ingl *major urinary protein*)

OLFM4 – olfaktomediin-4 (ingl *olfactomedin-4*)

pAb – polükloonaalne antikeha (ingl *polyclonal antibody*)

PBS – fosfaatpuhverdatud soolalahus (ingl *phosphate buffered saline*)

PHx – partsiaalne hepatektoomia (ingl *partial hepatectomy*)

RVM – rakuväline matriks

αSMA – alfa silelihase aktiin (ingl *alpha smooth muscle actin*)

SISSEJUHATUS

Maks on asendamatu organismi homeostaasi reguleerimisel, mistõttu maksakahjustused põhjustavad raskeid haiguseid, mille all üksnes Euroopa Liidus kannatab ligikaudu 29 mln inimest. Akuutse maksakahjustuse korral omab maks suurt regeneratiivset võimet, mis võimaldab täielikult organi funktsiooni taastada. Maksahaiguseid põhjustab krooniline maksakahjustus, millega kaasnev pidev põletikureaktsioon ja ebanormaalne rakuvälise maatriksi (RVM) ladestumine häirib regeneratsiooni. Pikka aega on arvatud, et kroonilise maksakahjustuse korral aktiveeruvad fakultatiivsed tüvi/eellasrakud, mis on võimelised *in vitro* diferentseeruma maksa parenhüümseteks rakkudeks: hepatotsüütideks ja biliaarseteks epiteelirakkudeks (ingl *biliary epithelial cell* – BEC). Hiljutised uurimused on küsitavaks muutnud nende rakkude *in vivo* panuse regeneratsiooni. Seevastu on leitud, et kroonilise kahjustuse järgses regeneratsioonis osalevad allesjäänud diferentseerunud rakud, mis on plastilised ja omandavad tüvirakulised omadused. Seetõttu oleks tähtis kindlaks teha, millised ümbritseva keskkonna signaalid reguleerivad diferentseerunud rakkude plastilisust. RVM on koe mitterakuline osa, mis pakub rakkudele struktuurset tuge ja reguleerib nende funktsioone: proliferatsiooni, diferentseerumist, polaarsust ja migratsiooni. RVMi muutused on tähtsad efektiivseks maksa regeneratsiooniks, kuid nende täpset rolli selles protsessis on vähe uuritud. RVMi funktsiooni väljaselgitamisel on otstarbekas keskenduda akuutsele maksakahjustusele, kuna selle järgsed muutused on regeneratsiooni toetavad ja taastavad maksa täieliku funktsiooni.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on kirjeldada akuutse maksakahjustuse põhjustatud muutuseid maksa RVMi komponentide ekspressioonitasemes ja lokalisatsioonis ning uurida nende mõju kahjustuse järel toimuvale rakkude proliferatsioonile.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Maks

Maks on tumepunase värvuse, pehme konsistentsi ja sileda välispinnaga elund, mis asub paremal pool kõhuõõnes diafragma all. Anatoomiliselt on eristatavad parem ja vasak sagar ning lisasagaratena väiksemad ruut- ja sabasagar. (Mahadevan, 2014)

Maks on ainus organ, mis omab duaalset verevarustust läbi maksaarteri ja portaal- ehk värativeeni. Maksaarter varustab maksa hapnikurikka arteriaalse verega, mis moodustab täielikust verevarustusest 25–30%. Portaalveeni kaudu jõuab kogu verevarustusest 70–75% moodustav hapnikuvaesem, kuid toksiinide- ja toitaineterikas venoosne veri, mis suubub portaalveeni maost, soolest, põrnast ja pankreasest pärinevatest veresoontest. Enne maksa sisenemist jagunevad portaalveen ja maksaarter kaheks. Elundi siseselt toimub mitu järjestikust hargnemist ja tekkivad veresoonte harud varustavad maksa sagarikes paiknevaid sinusoide, kust suubub veri sagariku keskel asuvasse tsentraalveeni. Vere liikumisel mööda sinusoide töötlevad maksa parenhüümsed rakud veres leiduvaid komponente. Tsentraalveenist liigub veri läbi parema, keskmise ja vasaku hepaatilise veeni alumisse õõnesveeni. (Malarkey jt., 2005; Mitra ja Metcalf, 2012; Müsch, 2014)

Organismi homeostaasi säilitamisel on maksal keskne roll, osaledes metabolismi reguleerimises, sekreteerides mitmekülgsed biosünteesiprodukte ja detoksifitseerides verega saabuvald kahjulikke aineid. Aset leiab seedekulglas imendunud toitainete töötlemine ja ladustamine: glükogenees, glükoneogenees, aminohapete trans- ja deamineerimine ning lipiidide metabolism. Lisaks sünteesitakse sapphappeid, kolesterooli, hormoone, albumiini ja teisi vereseerumi valke. (Mitra ja Metcalf, 2009; Si-Tayeb jt., 2010; Tanaka jt., 2011)

Maksa mitmekesiste funktsioonide tõttu on maksakahjustused raskete haiguste põhjustajateks (Si-Tayeb jt., 2010). Üksnes Euroopa Liidus kannatab maksahaiguste all ligikaudu 29 mln inimest (Blachier jt., 2013). Maksakahjustust tekitavad toksiinid, viirused, metabolismi või immuunsüsteemi häired ja sapiteede takistused (Stanger, 2015). Kui kahjustus on korduv ja pikaajaline, tekib krooniline põletikureaktsioon ja haava paranemise protsess, millega kaasneb maksa fibroos. Fibrootilises maksas esineb ebaharilikult suurenenud rakuvälise RVMi valkude süntees ja vähenenud degradatsioon. (Friedman, 2003; Neubauer jt., 2001) Fibroosi lõppstaadiumiks on maksa tsirroos, mille puhul on parenhüüm asendunud regeneratiivseid sõlmi sisaldava sidekoega. Seesugune koe struktuur häirib verevoolu ja maksa funktsioonide läbiviimist ning on soodne keskkond hepatotsellulaarse kartsinoomi tekkeks. (Schuppan ja

Afdhal, 2008) Maksa siirdamine on põhiline lõppstaadiumis maksahaiguste ravi (Machado ja Diehl, 2014), kuna aga organi siirdamist vajavate patsientide arv on suurem kui doonorite (Perera jt., 2009), on välja töötamisel erinevad rakkude siirdamisel tuginevad teraapiad, mis kasutavad nii diferentseerunud kui ka tüvirakke (Gehart ja Clevers, 2015). Nende teraapiate rakendamisel on tähtis haiglasliku fibrootilise keskkonna reorganiseerimine, soodustamaks siirdatud rakkude funktsionaalsust (Stanger, 2015). Lisaks on maksa diferentseerunud rakud plastilised ja omandavad kahjustuse korral tüvirakulised omadused. Nende omaduste täpne kirjeldamine ja reguleerivate mehhanismide mõistmine, võimaldaks stimuleerida patsientides otsest regeneratiivset vastust. (Aloia jt., 2016, vastuvõetud; Gehart ja Clevers, 2015)

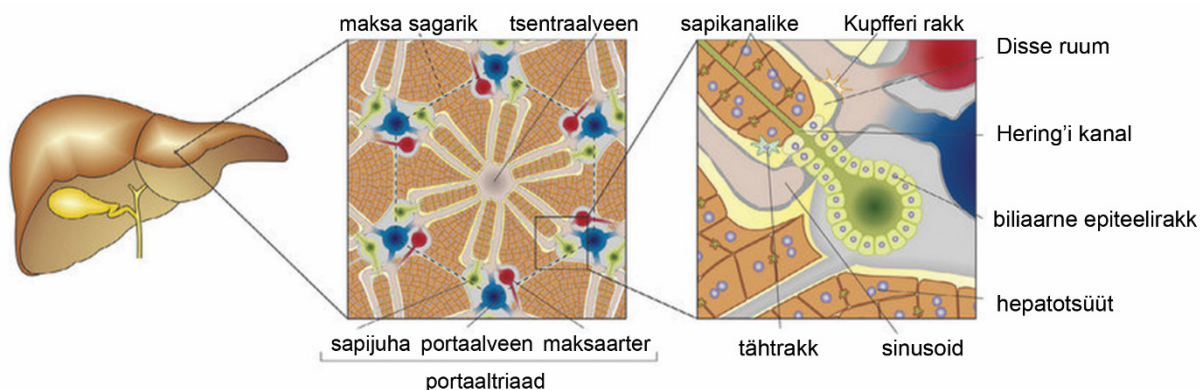
1.1.1. Maksa histoloogiline ehitus

Maksa funktsionaalseks üksuseks on kuusnurkne sagarik (joonis 1), mille keskel asub tsentraalveen ning nurkades portaaltiaadid, kus paiknevad maksaarteri, portaalveeni ja sapijuha harud (Si-Tayeb jt., 2010; Stanger, 2015). Veri liigub sagariku nurkadest keskossa mööda sinusoide, mille vahel on ühekihiliste rakuplaatidena maksa peamised parenhüümsed rakud – hepatotsüüdid (Si-Tayeb jt., 2010). Sinusoidide seinad moodustuvad fenestreeritud sinusoidaalsetest endoteelirakkudest, mistõttu on võimalik läbi sinusoidide ja hepatotsüütide vahele jääva Disse ruumi kahesuunaline ainete vahetamine vere ja hepatotsüütide basolateraalse pinna vahel (Braet ja Wisse, 2002).

Sinusoidides on maksa spetsiifilised makrofaagid ehk Kupfferi rakud, mis otsesel kokkupuutel verrega fagotsüteerivad sealseid mikroorganisme ja võõrkehi ning Disse ruumi läbimisel osalevad apoptootiliste hepatotsüütide elimineerimises (Pellicoro jt., 2014; Racanelli ja Rehmann, 2006). Disse ruumis paiknevad hepaatilised tähtrakud, mis oma sooma ja jätketega puutuvad kokku nii hepatotsüütide kui ka sinusoidaalsete endoteelirakkudega (Hellerbrand, 2013). Tegemist on maksa spetsiifiliste peritsüütidega, mis on olulised maksa RVMi produtseerijad ja vitamiin A hoiustajad (Pellicoro jt., 2014; Stanger, 2015).

Hepatotsüüdid on omavahel ühendatud tiheliidustega, mille abil moodustub sapikanalike, kuhu sekreteeritakse hepatotsüütide apikaalse pinna kaudu sapphappeid, mis seal koos bilirubiini ja kolesterooliga moodustavad sapi. Sapp liigub mööda sapikanalikest ja läbib Hering'i kanali, kus sapikanalike läheb üle portaaltriaadis paiknevaks sapijuhaks, mis on vooderdatud BECidega. Tegemist on maksa parenhüümsete rakkudega, mis osalevad sapi töötlemises ja sapipõide suunamises. Niisiis toimub sagarikus sapi liikumine verevoolule vastupidises suunas. (Gehart ja Clevers, 2015; Stanger, 2015)

Mitme sagariku kokkupuutekohal tekib sidekoega ümbritsetud portaalala, kus paiknevad portaaltriaad, lümfisooned ja närvid (Lepp, 2013).



Joonis 1. Maksa funktsionaalse üksuse ehk sagariku struktuur ja peamiste rakutüüpide paiknemine (Gehart ja Clevers, 2015, kohandatud).

Välisel vaatlusel paistab maksa histoloogia homogeenne, kuid tegelikult on rakkudel sagariku raames erinevad funktsioonid, mille alusel jaotatakse sagarik kolmeks tsooniks. Portaallala lähistel paiknevad rakud kuuluvad esimesse, sagariku keskosas olevad teise ja tsentraalveeni ümbritsevad kolmandasse tsooni. (Stanger, 2015) Hepatotsüütide puhul seisneb erinevus metabolismiga seotud geenide ekspressioonis (Miyajima jt., 2014), mis võimaldab vastandlikud metabolismirajad, nt glükolüüs ja glükoneogenees, sagarikus ruumiliselt eraldada ja seeläbi maksa funktsioone optimeerida ning metaboolset homeostaasi säilitada (Gebhardt ja Matz-Soja, 2014; Stanger, 2015). Sarnaselt viivad detoksifitseerivaid protsesse läbi eeskätt tsentraalveeni ümbritsevad hepatotsüüdid, kuna need ekspresseerivad detoksifitseerivaid ensüüme – P450 tsütokroome. See muudab peritsentraalsed hepatotsüüdid kõige vastuvõtlikumaks toksilistele kahjustustele. (Stanger, 2015) Lisaks hepatotsüütidele esinevad piirkondlikud erinevused ka sinusoidaalsete endoteelirakkude fenestratsioonide arvukuses ja Kupfferi rakkude funktsioonis (Brunt jt., 2014).

1.1.2. Maksa rakutüüpide tuvastamise markerid

Erinevaid rakutüüpe saab koest tuvastada ja eraldada neile spetsiifiliste antigeenide alusel. BECidele on omane tsütokeratiin-19 (ingl *cytokeratin-19* – CK19) ekspressioon (Shin jt., 2011). Hepatotsüüdid omakorda ekspresseerivad hepatotsüüdi tuumafaktor 4 alfa (ingl *hepatocyte nuclear factor 4 alfa* – HNF4 α) ja peamist uriini valku (ingl *major urinary protein* – MUP) (Malato jt., 2011; Schaub jt., 2014). Hepaatilisi tähttrake iseloomustab desmiini ekspressioon (Schaub jt., 2014). Maksas leiduvad hematopoeetilised rakud, mille hulka kuuluvad ka Kupfferi rakud, on tuvastatavad CD45 abil (Pellicoro jt., 2014; Shin jt., 2011).

1.2. Maksa regeneratsioon

Maksa regeneratsiooni käigus toimub koe kahjustuse tõttu hävinud rakkude ja RVMi taastamine (Moriya jt., 2012; Stanger, 2015). Toimuvat võib vaadelda kui haava paranemise protsessi, mille puhul parenhüümsete rakkude hävimine algatab põletikureaktsiooni aktiveerumise, angiogeneesi, hävinud rakkude eemaldamise ja asendamise ning RVMi komponentide sünteesi ja reorganiseerimise. Põletikureaktsiooni põhjustavad hepatotsüütide hävimisel vabanevad mediaatorid, mille mõjul toimub hematopoeetiliste rakkude invasioon kahjustuse piirkonda. (Machado ja Diehl, 2014; Neubauer jt., 2001; Pellicoro jt., 2014) Samuti aktiveeruvad tähttrakud, mis transdiferentseeruvad müofibroblasti-sarnaseks rakutüübiks, mis omab suurenenud kontraktiilsust, proliferatiivsust ja migreerumisvõimet. Need rakud on kahjustuse korral põhilised RVMi valkude produtseerijad. (Mederacke jt., 2013; Pellicoro jt., 2014) Koe hävinud rakke võivad asendada vähediferentseerunud somaatilised tüvirakud, mida iseloomustab võime alalhoida iseenda populatsiooni ja diferentseeruda erinevateks spetsialiseerunud rakutüüpideks (Kopp jt., 2016). Peale selle võivad koe taastamisse panustada allesjäänud rakud, mis suudavad prolifereeruda või transdiferentseeruda, st muutuda ühest diferentseerunud rakutüübist teiseks (Stanger, 2015).

Maksas sõltub regeneratsiooni mehhanism seda esile kutsuva protsessi olemusest (Stanger, 2015). Hepatotsüütide põhine koe uuenemine on eelistatud viis koe taastamiseks homeostaasi säilitamisel ja akuutse kahjustuse korral (Fausto ja Campbell, 2003; Stanger, 2015). Pikaajaline krooniline kahjustus toob kaasa hepatotsüütide proliferatiivse võimekuse alanemise, mistõttu selles olukorras peaks toimima alternatiivne tee (Itoh ja Miyajima, 2014; Tanimizu ja Mitaka, 2014). Pikka aega on arvatud, et regeneratsiooniprotsessis osalevad fakultatiivsed tüvi/eellasrakud, mis homeostaatilistes tingimustes on unipotentsed diferentseerunud rakud, kuid erinevate kahjustuste tõttu omandavad tüvirakulised omadused ja muutuvad multipotentseks (Yanger ja Stanger, 2011). Hiljutised uurimused on aga küsitavaks muutunud seesuguste rakkude rolli *in vivo* (Schaub jt., 2014; Tarlow jt., 2014a; Yanger jt., 2014) ja on välja pakutud, et koe uuenemist võimaldab diferentseerunud rakkude plastilisus (Kopp jt., 2016). Plastilisus võimaldab ühe rakutüübi raames vastusena rakusisestele või -välistele stiimulitele muuta kontrollitud viisil raku võimet ja omadusi (Aloia jt., 2016, vastuvõetud). Diferentseerunud rakud võivad dediferentseeruda ja seeläbi omandada tüvirakulisi omadusi ning panustada koe taastamisse (Aloia jt., 2016, vastuvõetud; Kopp jt., 2016).

1.2.1. Maksa homeostaatiline regeneratsioon

Normaalse elutegevuse käigus hävinud hepatotsüütide asendamine saab toimuda läbi säilinud hepatotsüütide proliferatsioon või tüvi/eellasrakkude diferentseerumise (Stanger, 2015). Zajicek jt viisid läbi katse, kus süstisid hiirtesse radioaktiivse märgisega nukleotiidi analoogi, mis märgistas DNAd sünteesivad rakud. Maksas leiti märgistatud rakud algselt periportaalselt ja viie nädala jooksul täheldati nende liikumist tsentraalveeni suunas. Sellest järeldati, et maksas toimub aeglane rakkude uuenemine ja tekkinud rakkude „voolamine“ mööda sagarikku. (Zajicek jt., 1985) Samasugust rakkude liikumist näitas ka Furuyama jt läbiviidud eksperiment, kus uuriti Cre-rekombinaas-vahendatud geneetiliselt märgistatud sapijuhade piirkonnas asuvatest tüvi/eellasrakkudest diferentseerunud hepatotsüüte (Furuyama jt., 2011). Vaatamata katse tulemustele, on siiski valdavalt levinud aramus, et hävinud hepatotsüüdid taastatakse läbi olemasolevate hepatotsüütide proliferatsiooni, mida on tõestanud nii hepatotsüütide (Malato jt., 2011) kui ka BECide geneetiline märkimine (Español-Suñer jt., 2012; Rodrigo-Torres jt., 2014; Yanger jt., 2014). Samuti on näidatud, et märgistatud periportaalsed hepatotsüüdid ei liigu tsentraalveeni suunas (Tarlow jt., 2014a). Tulemuste vastuolulisus arvatakse seisnevat meetodina kasutatava Cre-rekombinaas-vahendatud geneetilise rakkude järglaskonna märkimisel valitavas rakutüübi spetsiifilises markeris. Kasutades markerit, mis avaldub ühe kindla rakutüübi asemel mitmes, võib jääda mulje, et ühest rakust tekib teine, kuigi tegelikult on algselt märgistatud erinevad rakutüübid. (Yanger jt., 2014)

Hiljuti on tõestust leidnud hüpotees, et hepatotsüüdid on oma regeneratsioonivõime osas heterogeensed. Wang jt näitasid, et tsentraalveeni juures paiknev hepatotsüütide alampopulatsioon on ülejäänud hepatotsüütidega võrreldes proliferatiivsem ja nende tütararakud, liikudes tsentraalveeni ümbrusest portaalala suunas, moodustavad aasta möödudes 40% sagariku hepatotsüütidest. Populatsiooni reguleerivad tsentraalveeni ümbruses paiknevate endoteelirakkudest pärinevad Wnt signaalmolekulid. (Wang jt., 2015) Niisiis on hepatotsüüdid heterogeensed mitte ainult metaboolsete ja detoksifitseerivate omaduste poolest (Stanger, 2015), vaid ka jagunemisvõime osas (Wang jt., 2015).

1.2.2. Maksa regeneratsioon pärast partsiaalset hepatektoomiat

Maksa suurt regeneratiivset võimet illustreerib taastumine pärast osalist maksa eemaldusloikust ehk partsiaalset hepatektoomiat (ingl *partial hepatectomy* – PHx). 70% PHx käigus eemaldatakse maksa sagarad, kahjustamata allesjäävat kude. Protseduuri järel toimub närilistel ligikaudu nädala jooksul organi algse massi ja funktsiooni taastumine. (Miyaoaka jt., 2012; Stanger, 2015) Küll aga ei kasva eemaldatud sagarad tagasi ja ei taastu elundi algne arhitektuur,

vaid toimub säilinud osa suurenemine (Itoh ja Miyajima, 2014). Miyaoka jt näitasid, et regeneratsiooni mehhanism sõltub PHx ulatusest ja organi taastumine toimub hüpertroofia ning rakkude proliferatsiooni koosmõjul. (Miyaoka jt., 2012) Hepatotsüütide proliferatsioonile järgneb ka ülejäänud maksas leiduvate rakutüüpide jagunemine (Taub, 2004).

1.2.3. Maksakahjustuste uurimiseks kasutatavad katseloomad

Maksakahjustuste uurimiseks kasutatakse katseloomadena närilisi, põhiliselt hiiri, kuna neid on kerge pidada ja aretada, nad on inimesega geneetiliselt sarnased ning erinevatele uurimisküsimustele vastamiseks saab luua transgeenseid hiiri, nt geennokauditud või Cre-rekombinaas-vahendatud geneetiliselt märgistatud rakkude järglaskonnaga isendeid. (Liu jt., 2013; Stanger, 2015)

Toksiinide põhjustatud maksakahjustuse mudelina on levinud süsiniktetrakloriidi (ingl *carbon tetrachloride* – CCl₄) kasutamine (Liedtke jt., 2013). Peritsentraalsetes hepatotsüütides ekspresseeritavate P450 ensüümide hulka kuuluv tsütokroom P450 2E1 (ingl *cytochrome P450 2E1* – CYP2E1) viib läbi protsessi, mille käigus CCl₄-st saadakse toksiline triklorometüülradikaal (CCl₃), mis põhjustab membraansete struktuuride kahjustust ja hepatotsüütide nekroosi (Liu jt., 2013; Starkel ja Leclercq, 2011). Akuutne kahjustus aktiveerib haava paranemise protsessi: immuunrakkude poolt kahjustunud hepatotsüütide elimineerimise, RVMi produtseerimise ja allesjäänud rakkude proliferatsiooni (Starkel ja Leclercq, 2011). Fibroosi tekitamiseks ja uurimiseks tuleb CCl₄ manustada korduvalt mitme nädala jooksul (Liedtke jt., 2013). CYP2E1 ekspresseerub peamiselt maksas, mistõttu CCl₄ ei kahjusta teisi organeid (Liu jt., 2013).

Sapijuhade kahjustust võimaldab uurida 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiini (ingl *3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine* – DDC) dieet, mille toimetel on täheldatud ka tüvi/eellasrakkude aktiveerumist ja proliferatsiooni (Liedtke jt., 2013). Tüvi/eellasrakkude teket soodustab ka koliini-defitsiitne dieet koos etioniini manustamisega (ingl *choline-deficient ethionine-supplemented diet* – CDE dieet) (Akhurst jt., 2001).

1.2.4. Maksa regeneratsioon pärast akuutset ja kroonilist maksakahjustust

Akuutse maksakahjustuse esinemisel taastub kude hepatotsüütide proliferatsiooni tagajärjel (Fausto ja Campbell, 2003) ja hepatotsüütide tekkimist BECidest ega teistest rakutüüpidest tuvastatud ei ole (Español-Suñer jt., 2012; Malato jt., 2011). Malato jt uurisid ühekordse CCl₄ doosi põhjustatud akuutse maksakahjustuse järgset regeneratsiooni geneetiliselt märgistatud hepatotsüütidega transgeenses hiires. 48 h pärast kahjustust oli näha tsentraalveeni ümbritsevate

hepatotsüütide nekroos. Selles piirkonnas puudus geneetilisest märgistatud rakkude signaal, kuid esines nõrgalt hepatotsüütide markerit MUPi. Portaalas CCl₄ kahjustust ei põhjustanud. (Malato jt., 2011)

Kroonilise maksakahjustuse korral toimub fakultatiivsete tüvi/eellasrakkude aktiveerumine ja diferentseerumine hepatotsüütideks ning BECideks (Tanaka jt., 2011). Tõenäoliselt pärinevad rakud portaalas paiknevatest BECidest, millega nad omavad osaliselt kattuvat geeniekspressiooni mustrit (Itoh ja Miyajima, 2014; Rodrigo-Torres jt., 2014). Kasutades spetsiifilisi markereid, on võimalik tüvi/eellasrakke maksast eraldada ja *in vitro* hinnata nende proliferatiivsust ja diferentseerumisvõimet (Miyajima jt., 2014). Seesugused katsed on näidanud, et terves ja/või kahjustunud maksas paiknevad portaalas bipotentsed rakud, mis suudavad moodustada *in vitro* ühest rakust tekkivaid heterogeenseid kolooniaid, kus esineb hepatotsüütide ja BECide markeritega rakke. Vastavalt rakkude kasvatamise tingimustele saab rakke suunata diferentseeruma mõlemaks rakutüübiks. (Dorrell jt., 2011; Huch jt., 2013; Shin jt., 2011) Samuti on tõestatud selliste rakkude võime katselooma siirdamisel anda funktsionaalseid ja täielikult diferentseerunud hepatotsüüte (Huch jt., 2013).

Cre-rekombinaas-vahendatud geneetiline rakkude järglaskonna märkimine on lasknud *in vivo* hinnata tüvi/eellasrakkude rolli hepatotsüütide populatsiooni taastamises (Stanger, 2015). Märkimisel on juhitud BECide spetsiifilistest markeritest, mis märgistavad ka arvatavad tüvi/eellasrakud, mis peaks krooniliste CDE ja DDC dieedi ning CCl₄ kahjustuse korral suutma diferentseeruda hepatotsüütideks (Español-Suñer jt., 2012; Furuyama jt., 2011; Rodrigo-Torres jt., 2014). Kõige märkimisväärsema tüvi/eellasrakkude panuse tuvastasid Furuyama jt katsed, kus tekkisid märgistatud hepatotsüüdid kõikide eelpool nimetatud krooniliste kahjustuste korral (Furuyama jt., 2011). Teised uurimused jõudsid mõnevõrra tagasihoidlikumate tulemusteni, näidates, et tüvi/eellasrakke tekitab vaid CDE dieet ja märgistatud hepatotsüütide hulk jääb u 1–2,5% vahele (Español-Suñer jt., 2012; Rodrigo-Torres jt., 2014). Neid tulemusi kontrollisid Schaub jt, kes kasutasid kolme erinevat transgeenset hiiremudelit, kus märgistati hepatotsüüdid, mesenhümaalsed rakud ja BECid. Katsete tulemusel selgus, et CDE dieedi puhul ei teki hepatotsüüdid teistest rakutüüpidest. (Schaub jt., 2014) Sarnasele järeldusele jõuti viies läbi geneetilist rakkude järglaskonna märkimist, kasutades erinevat transgeenset hiirt, kuid sama BECi markerit, mis Furuyama jt katsetes (Tarlow jt., 2014a). Hepatotsüütide põhist regeneratsiooni tõestasid ka Yanger jt, kasutades rakkude järglaskonna tuvastamiseks nii kiirelt jagunevate rakkude märkimist nukleotiidi analoogide abil kui ka BECide ja hepatotsüütide Cre-rekombinaas-vahendatud geneetilist märkimist (Yanger jt., 2014). Järelikult ei teki erinevate krooniliste maksakahjustuste korral *in vivo* hepatotsüüte sapiteedest pärinevatest

tüvi/eellasrakkudest või mõnest muust rakupopulatsioonist, vaid hepatotsüüdid taastatakse läbi olemasolevate hepatotsüütide proliferatsiooni (Schaub jt., 2014; Tarlow jt., 2014a; Yanger jt., 2014).

Pikaajalise DDC dieedi põhjustatud kroonilise maksakahjustuse järel on tuvastatud *in vivo* hepatotsüütidest nii BECide kui ka hepatotsüütide markeritega tüvi/eellasrakkude teke. Seesugused rakud on võimelised diferentseeruma BECide sarnasteks rakkudeks ja kahjustust esile kutsuva protsessi lakkamisel tagasi funktsionaalseteks hepatotsüütideks. (Tarlow jt., 2014b; Yanger jt., 2013) Lisaks kahjustusele on selline transdiferentseerumine saavutatav ka välise Notch signaalraja aktiveerimisega (Yanger jt., 2013). Seega võivad kroonilise kahjustuse järel tekkivad bipotentsed rakud pärineda hepatotsüütidest mitte biliarsetest rakkudest (Tarlow jt., 2014b).

Periportaalselt paiknevatest BECidest pärinevate tüvi/eellasrakkude diferentseerumist hepatotsüütideks on siiani peaaesjalikult tõestatud *in vitro* katsetega (Dorrell jt., 2011; Huch jt., 2013; Shin jt., 2011), mis iseloomustavad rakkude potentsiaali, kuid ei peegelda alati elusorganismis toimuvat (Kopp jt., 2016; Yanger jt., 2014). Cre-rekombinaas-vahendatud geneetiline rakkude järglaskonna märkimine, mis laseb hinnata rakkude omadusi füsioloogilistes tingimustes, pole tuvastanud kahjustuse esinemisel BECidest pärinevate tüvi/eellasrakkude olulist rolli hepatotsüütide taastamises (Schaub jt., 2014; Tarlow jt., 2014a; Yanger jt., 2014). *In vitro* katsete erinev tulemus *in vivo* omadest võib olla põhjustatud rakkude omaduste muutumisest, mis tekib nende eemaldamisel füsioloogilisest keskkonnast (Schaub jt., 2014). Sellegipoolest on rakukultuuris tekkivad bipotentsed rakud ja nende klonogeensed omadused olulised terapeutiliste uuringute seisukohast (Grompe, 2014). Lisaks ei tähenda Cre-rekombinaas vahendatud geneetilise märkimise tulemused, et tüvi/eellasrakke kindlasti ei eksisteeri, vaid võib viidata kasutatavate mudelite ebapiisavusele neid rakke aktiveerida (Schaub jt., 2014; Yanger jt., 2014). Siiski viitavad enamuse katseid, et kõige suuremat ja mitmekesisemat rolli maksa regeneratsioonis omavad allesjäävad hepatotsüüdid (Stanger, 2015), mille erinevad alampopulatsioonid panustavad homeostaasi ja kahjustuse järgsesse regeneratsiooni (Font-Burgada jt., 2015; Wang jt., 2015) ning mis on võimelised kroonilise kahjustuse tingimustes muutuma BECide markereid ekspresseerivateks tüvi/eellasrakkudeks (Tarlow jt., 2014b; Yanger jt., 2013). Seetõttu oleks tähtis kindlaks teha, millised ümbritsevast keskkonnast pärinevad signaalid reguleerivad hepatotsüütide plastilisust (Kopp jt., 2016).

1.3. RVM

RVM on veest, polüsahhariididest ja valkudest koosnev koe mitterakuline osa, mida toodavad koes esinevad rakud (Frantz jt., 2010). RVM organiseerib rakke kudedeks ja organiteks ning rakusiseste signaalradade reguleerimise kaudu mõjutab raku funktsioone ning koe ja organi füsioloogilisi omadusi (Alberts jt., 2015). Sünteesitava RVMi koostise ja komponentide organiseerumise mitmekülgselt struktuuriks määrab ära organismi arengu käigus toimuv erinevate rakutüüpide interaktsioon omavahel ja väliskeskkonnaga, millest tulenevalt on RVM koospetsiifiline ning võib erineda sama koe raames (Frantz jt., 2010).

RVM koosneb ligikaudu 300st erinevast valgust, mis jagunevad kolme rühma: kollageenid, proteoglükanaid ja glükoproteiinid (Hynes jt., 2012). Kollageenide perekond moodustub erineva ehituse ja funktsiooniga alamtüüpidest, mis annavad koele struktuurse tugevuse (Hynes jt., 2012; Ricard-Blum, 2011). Proteoglükanaid sisaldavad valgulise tuumaga kovalentselt seotud glükosaminoglükani (GAG) ahelaid, mis moodustuvad disahhariidide kordustest (Rozario ja DeSimone, 2010). GAGi ahelad hõlmavad rakuvälises ruumis suure ala ja oma tugeva negatiivse laengu tõttu seovad divalentseid katioone ning vett, moodustades hüdreeritud geeli (Alberts jt., 2015). Proteoglükanaidest tekkiv substants on koes leiduvate vaheruimide täitja, mis seob erinevaid RVMi komponente ja kasvufaktoreid, võimaldab molekulide kiiret difusiooni ning annab organile võime väljaspoolt tulevate survejõude vastu panna (Alberts jt., 2015; Hynes, 2009). Kolmanda suure valkude rühma moodustab u 200 erinevat glükoproteiini, mille funktsioonide hulka kuulub rakkude adhesiooni ja signaliseerimise vahendamine, kasvufaktorite sidumine ning RVMi iseloomuliku struktuuri moodustamine. Glükoproteiine esindavad fibronektiin, laminiinid ja elastiin. (Hynes jt., 2012)

RVMi valgud sisaldavad iseloomuliku aminohappelise järjestusega domeene, mille paigutus ja kontekst on valguspetsiifiline (Hynes jt., 2012). Domeenid seovad lähedal paiknevate rakkude transmembraanseid pinnaretseptoreid, lahustuvaid kasvufaktoreid või teisi RVMi komponente, moodustades komplekse struktuuri (Hynes, 2009; Hynes jt., 2012). Raku transmembraansete retseptorite rakuväline osa seostub RVMi komponendi spetsiifilise domeeniga (Hynes, 2009) ja tsütoplasmaatiline osa signaaliülekanne vahendavate valgukompleksidega ning raku tsütoskeletiga (Geiger ja Yamada, 2011). Levinuim RVMi ja raku vahelist seostumist ning signaaliülekanne edastav retseptor on heterodimeerne α - ja β -ahelast koosnev integriin (Hynes jt., 2012). Integriinide vahendusel väliskeskkonnast rakku jõudvad signaalid mõjutavad raku kuju, polaarsust, migreerumist, prolifereerumist, diferentseerumist ja apoptoosi (Yurchenco, 2011). Lisaks transmembraansetele retseptoritele võivad signaaliülekanne vahendada rakkude

sünteesitavad ja sekreteeritavad kasvufaktorid, mis stimuleerivad rakkudes makromolekulide sünteesi ja rakkude kasvu (Alberts jt., 2015). Kasvufaktorite seostumine RVMi komponentide spetsiifiliste domeenidega muudab need inaktiivseks ja lokaliseerib kasvufaktorid rakuvälises ruumis kindlatesse piirkondadesse, kus neid on vajaduse korral võimalik vabastada ja aktiveerida läbi RVMi komponendi degradatsiooni. Lisaks ei pea kasvufaktor oma retseptoriga seostumiseks vabanema RVMi komponendist ja viimane võib käituda kui koretseptor. Samuti võib RVMi komponent või selle fragment seonduda otse kasvufaktori retseptorile ja algatada signaaliülekanne rakku. (Hynes, 2009) Peale rakkude mõjutamise omab RVM tähtsat rolli rakkudele toe ning seostumiseks ja migreerumiseks vajaliku pinna tagamisel (Humphrey jt., 2014).

Vastavalt paiknemisele ja valgulisele koosseisule jaotatakse RVM basaalmembraaniks ja rakuvaheliseks maatriksiks (Bonnans jt., 2014). Rakuvaheline maatriks on sidekoes rakke ümbritsev kiuline ja poorne RVMi võrgustik, mis koosneb peamiselt fibroblastide produtseeritud I ja III tüüpi kollageenist, elastiinist, fibronektiinist, tenaskiinist ja erinevatest proteoglükaanidest (Bonnans jt., 2014; Frantz jt., 2010; Singh jt., 2012). Basaalmembraan on 50–100 nm paksune rakupinnaga seotud spetsialiseerunud RVMi kiht, mis asetseb epiteeli- ja endoteelirakkude all, pakkudes rakkudele toetumis- ja seostumispinda ning eraldades neid sidekoest (Bonnans jt., 2014; Yurchenco, 2011). Kahjustuse järel säilitab basaalmembraan koe arhitektuuri ja kahjustust parandavatele rakkudele migreerumiseks vajaliku pinna (Alberts jt., 2015). Peale selle on basaalmembraan selektiivseks barjääriks, määrab ära rakkude polaarsuse ja vahendab signaaliülekannet. Basaalmembraani põhilised komponendid on laminiinid, IV tüüpi kollageen, nidogeen, perlekaan ja agriin. (LeBleu jt., 2007; Yurchenco, 2011)

RVM on dünaamiline struktuur, mille koostist on vaja pidevalt uuendada ja reorganiseerida (Frantz jt., 2010; Lu jt., 2011). Koosseisu saab muuta soodustades ühtede komponentide sünteesi või teiste degradatsiooni (Lu jt., 2011). RVMi valkude degradatsiooni viivad eeskätt läbi maatriksi metalloproteinaasid (ingl *matrix metalloproteinase* – MMP), mis on laia substraadispetsiifikaga ensüümid. Normaalses füsioloogilistes tingimustes on MMPde aktiivsus madal, kuid kahjustuse korral tõuseb. Lisaks RVMi hulga ja koostise muutmisele vabastavad MMPd maatriksist kasvufaktoreid ja bioloogilise aktiivsusega RVMi komponentide fragmente. MMPde aktiivsust reguleerivad ja tasakaalustavad koe metalloproteinaasi inhibiitorid. (Bonnans jt., 2014; Hynes, 2009) Koe kahjustuse vältimiseks on tähtis, et RVMi komponentide süntees, degradatsioon ja reorganiseerimine oleks kindlalt reguleeritud. Ebanormaalne RVMi ümberkujundamine võib kaasa tuua patoloogiliste seisundite, nt fibroosi ja kasvaja, tekke. (Bonnans jt., 2014; Lu jt., 2011)

RVMis esinevad komplekset struktuuri moodustavad komponendid ja peamiselt rakkude funktsioone reguleerivad valgud. Käesoleva töö eksperimentaalses osas uuritakse põhikomponentidest IV tüüpi kollageeni, elastiini, fibronektiini ja biglükuaani ning regulatiivsetest komponentidest olfaktomediin-4 (ingl *olfactomedin-4* – OLFM4), armadillo kordust sisaldavat X-seoselist valk (ingl *armadillo repeat-containing X-linked protein* – ARM CX) 2 ja vitronektiini, mistõttu kirjeldatakse järgnevates alapeatükkides eelkõige neid.

1.3.1. RVMi põhikomponendid

Suure RVMi komponentide rühma moodustavad kollageenid, mis koosnevad kolmest polüpeptiidist ehk α -ahelast, mis üksteise ümber keerdudes moodustavad homo- või heterotrimeerse heeliksi. α -ahela aminohappelises järjestuses esineb kollageenidele iseloomulik Gly-X-Y triplett, kus X tähistab tavaliselt proliini ja Y hüdroksüproliini. Seesugune tripel-helikaalne struktuur võib esineda kogu molekuli raames või olla katkestatud mitte-kollageensete domeenidega, mis annavad molekulile painduvuse ja vahendavad seostumist. (Ricard-Blum, 2011) Imetajatel ekspresseeritakse 28 erinevat kollageeni, mis vastavalt struktuurile ja funktsioonile jaotuvad fibrillideks, ankurdavateks fibrillideks, fibrillidega seotud ja võrgustikku moodustavateks kollageenideks (Gordon ja Hahn, 2011; Ricard-Blum, 2011). Võrgustikku moodustab basaalmembraanis leiduv IV tüüpi kollageen, mis omab kolme erinevat tripel-heeliksi katketega heterotrimeerset isovormi (Khoshnoodi jt., 2008). IV tüüpi kollageeni puudumisel toimub hiire varajases embrüogeneesis basaalmembraani sarnase struktuuri moodustumine, kuid tekkinud struktuur ei ole terviklik ja stabiilne, mistõttu hilisemas embrüonaalses arengus tekivad basaalmembraani funktsioonis letaalsed defektid (Pöschl jt., 2004). Koele struktuurse tugevuse ja võime venitusjõule vastu panna annavad pidevast tripel-heeliksist koosnevad jäigad ja stabiilsed kollageeni fibrillid (Hynes jt., 2012; Mouw jt., 2014). Nende levinuimaks esindajaks on I tüüpi kollageen, mis moodustab koos V tüüpi kollageeniga heterotüüpseid fibrille, mida leidub rakuvahelises maatriksis (Boot-Handford ja Tuckwell, 2003; Frantz jt., 2010). Koe venitamist piiravate ja rebenemist ennetavate kollageeni fibrillidega on organismis lähedalt seotud elastiinkiud (Alberts jt., 2015).

Elastiinist ja mikrofibrillidest moodustuvad elastiinkiud muudavad koed ja organid elastseks, mis võimaldab neil pärast venitust algolekusse naasta (Wise ja Weiss, 2009). Enim leidub elastiinkiude nahas, kopsudes ja veresoontes (Alberts jt., 2015). Elastiinkiududest ligikaudu 90% moodustava elastiini prekursoriks on tropoelastiin, mida eeskätt sünteesivad ja sekreteerivad veresoonte silelihasrakud ning fibroblastid (Kielty, 2006). Tropoelastiinis on kaks erineva funktsionaalsusega domeeni: hüdrofoobne vastutab elastsete omaduste ning hüdrofiilne

teiste molekulidega seostumise eest (Alberts jt., 2015; Wise ja Weiss, 2009). Tropoelastiini kodeerib üks geen, millelt alternatiivse spalissingu tulemusena saadakse erinevad valgu isovormid (Wise ja Weiss, 2009). Geeni homosügootne nokaut on hiiretele sünnijärgselt letaalne, kuna elastiini puudumisega kaasneb veresoonte silelihasrakkude kontrollimatu proliferatsioon ja veresoonte ummistumine (Li jt., 1998). Karnik jt viisid läbi katsed, mis näitasid, et elastiin püsib veresoonte silelihasrakkude proliferatsiooni, aitab tekitada rakkude normaalset kontraktiilset fenotüüpi ja kontrollib migratsiooni (Karnik jt., 2003). Seega on elastiini funktsiooniks nii kudede ja organite elastsuse tagamine kui ka rakkude käitumise mõjutamine (Karnik jt., 2003; Wise ja Weiss, 2009).

RVMi komponentide seostumist omavahel ja raku pinnaga vahendab fibronektiin (Mouw jt., 2014). Fibronektiin on dimeerne glükoproteiin, mis moodustub C-terminaalsest osast kahe disulfiidsillaga ühendatud polüpeptiidahelatest. Subühikud koosnevad peaaesjalikult kolmest korduvast domeenist, mis omavad erinevat ligandi seostumisspetsiifikat, sidudes teisi fibronektiini molekule, kollageeni, hepariini, fibriini ja integriini. Organismis leidub fibronektiin lahustuva inaktiivse vormina kehavedelikes või lahustumatu kiulise vormina RVMis. (Pankov ja Yamada, 2002) Fibronektiini fibrillide moodustamine rakuväliselt sõltub rakupinna retseptoritega seostumisest, mis läbi valgu struktuuris toimuvad konformatsioonilised muutused ja avalduvad krüptilised seostumissaidid (Halper, 2014). Fibronektiin mõjutab rakkude adhesiooni ja migratsiooni (Schwarzbauer ja DeSimone, 2011) ning valgu süntees intensiivistub fibrootilistes ja kahjustusest taastuvates kudedes (Halper, 2014).

Suurima proteoglükaanide perekonna moodustavad väikesed leutsiini-rikkad proteoglükaanid, mille valguline osa koosneb leutsiini-rikaste kordustega põhiosast ning N- ja C-terminaalsetest tsüsteiini sisaldavatest motiividest (Iozzo ja Schaefer, 2015; McEwan jt., 2006). Perekonna esindajaks on biglügen, mille valgulise tuuma N-terminaalse osaga on seotud kaks GAGi ahelat (Bischof jt., 2013; Theocharis jt., 2015). Biglügen omab RVMis struktuurset rolli, sidudes tropoelastiini ja erinevat tüüpi kollageene ning seeläbi osaledes nende kiulise struktuuri moodustamises (Douglas jt., 2006; Reinboth jt., 2002). Põletikureaktsioonis käitub lahustuv biglügen signaalmolekulina ja seostub makrofaagide pinnal paiknevate Toll-sarnaste retseptoritega. Seostumine aktiveerib rakusisesed signaalrajad, mistõttu toodetakse põletikureaktsiooni soodustavaid tsütokiine ja makrofaagide infiltratsiooni esile kutsuvaid kemoatraktante. (Schaefer jt., 2005) Infiltratsioonivad makrofaagid hakkavad ise biglügeni produtseerima, seeläbi põletikulist vastust võimendades (Moreth jt., 2012; Schaefer jt., 2005). Lahustuv biglügen pärineb RVMist selle degradatsioonil või toodetakse makrofaagide poolt tsütokiinide toimet (Schaefer jt., 2005).

1.3.2. RVMi regulatiivsed komponendid

Imetajates moodustavad olfaktomediini perekonna 13 glükoproteiini, mille C-terminaalses osas on iseloomulik olfaktomediini domeen (Guette jt., 2015). Nende hulka kuuluva OLFM4 puhul on näidatud rakusisest lokalisatsiooni nii tuuma ja mitokondritesse kui ka perinukleaarsesse tsütoplasmasse ja plasmamembraani. Samuti esineb valku rakuväliselt multimeeridena. (Guette jt., 2015; Liu jt., 2006; Zhang jt., 2004) OLFM4 seostub raku pinnal paikneva kaderiini ja lektiinidega ning vahendab rakkude adhesiooni (Liu jt., 2006). Erinevates kasvajatüüpides on tuvastatud kõrge OLFM4 ekspressioonitase (van der Flier jt., 2009; Zhang jt., 2004) ja näidatud, et OLFM4 mõjub kasvajakrakkudele anti-apoptootiliselt ning kasvu soodustavalt (Zhang jt., 2004). Soolestikus esineb OLFM4 krüpti põhjas paiknevates tüvirakkudes (van der Flier jt., 2009), kus Notch signaalraja inhibeerimine toob kaasa OLFM4 mRNA taseme languse ja raja pidev aktivatsioon mRNA taseme tõusu (VanDussen jt., 2012).

Vitronektiin on glükoproteiin, mida leidub RVMis ja vereplasmas (Leavesley jt., 2013; Schwartz jt., 1999). Vitronektiini struktuuris on eristatav integriini seostumist vahendav RGD-järjestus ning plasminogeeni aktivaator inhibiitor-1 siduv ja stabiliseeriv somatomediin B domeen (Rozario ja DeSimone, 2010; Zhou jt., 2003). Kahjustuse korral reguleerib vitronektiin haava paranemist. Jang jt uurisid valgu geennokauditud hiirt ja leidsid, et vitronektiini puudumisel toimub haava paranemine ja kokkutõmbumine viivitusega ning on häiritud normaalne angiogenees. Samuti tuvastati vitronektiini osalemine plasminogeeni aktivatsiooni rajas ja seeläbi fibrinolüüsi reguleerimises. (Jang jt., 2000) Vitronektiin võib haava paranemisel stimuleerida rakkude migratsiooni, seostudes rakupinnal paiknevate integriinidega (Stefansson ja Lawrence, 1996).

Armadillo kordust sisaldavad valgud omavad iseloomulikku 42st aminohappest koosnevat motiivi ja on seotud kudede terviklikkuse tagamise, kartsinogeneesi, rakkude adhesiooni ja migratsiooniga (Huber jt., 1997; Smith jt., 2005). Kurochkin jt avastasid kolm uutset armadillo kordust sisaldavat valku, mille hulka kuulub ühe armadillo korduse ja N-terminaalse transmembraanse osaga ARM CX2. ARM CX2 ekspressiooni uurimisel kasvajaspetsiifilistes koeproovides ja rakukultuurides leiti, et ARM CX2 mRNA pole tuvastatav epiteelirakkudest pärinevates kartsinoomides. (Kurochkin jt., 2001) Samuti on näidatud, et kahe armadillo korduse ja ARM CX2ga osaliselt homoloogse (Kurochkin jt., 2001) ARM CX1 üleekspressioon suudab inhibeerida kartsinoomi rakkude proliferatsiooni (Iseki jt., 2012). Järelikult võivad ARM CX-perekonna valgud olla kasvajate supressorvalgud ja reguleerida rakkude normaalset kasvu (Iseki jt., 2012; Kurochkin jt., 2001).

1.4. Maksa RVM ja regeneratsioon

Maksa regeneratsioonis on oluline roll RVMil, mille süntees ja ümberkujundamine on vajalik efektiivseks koe uuenemiseks (Williams jt., 2014). Akuutse maksakahjustuse puhul osaleb RVM koe algse seisundi taastamises, kuid kahjustuse pideval kordumisel ei suudeta paranemise käigus sünteesitud ja ladestunud valke reorganiseerida ning toimub maksa parenhüümi asendumine RVMiga ehk tekib maksa fibroos (Bataller ja Brenner, 2005; Neubauer jt., 2001).

1.4.1. Maksa RVM

RVMi koostis ja organiseerumine on koespetsiifiline (Frantz jt., 2010). Maksas leidub RVM üldjuhul veresoonte lähistel: portaalalas, tsentraalveeni ja sinusoidide ümber (Bedossa ja Paradis, 2003). Portaalveeni, tsentraalveeni, maksaarteri ja sapijuha harudes leidub eeskätt laminiinidest, IV tüüpi kollageenist, nidogeenist ja perlekaanist koosnev basaalmembraan (Martinez-Hernandez ja Amenta, 1995). Veresoonte harudes leidub tüüpilistele basaalmembraani komponentidele lisaks ka fibronektiini (Hahn jt., 1980) ja elastiini (Chen jt., 2014). Sinusoidide ja hepatotsüütide vahelises Disse ruumis pidev basaalmembraan puudub (Brunt jt., 2014) ja selle asemel paiknevad hõredalt I, III ja IV tüüpi kollageenid ning fibronektiin (Clement jt., 1986). Seesugune basaalmembraani sarnane struktuur võimaldab kiiret ainete vahetust vereplasma ja hepatotsüütide vahel (Friedman, 2003; Martinez-Hernandez ja Amenta, 1995) ning muutused Disse ruumi RVMi koostises ja hulgas põhjustavad maksa funktsiooni häireid (Bedossa ja Paradis, 2003).

1.4.2. Muutused maksa RVMis maksakahjustuse järel

Regeneratsiooni käigus võivad koe rakulise osa taastada vähediferentseerunud somaatilised tüvirakud, mida mõjutab ümbritsev tüviraku nišš (Kopp jt., 2016; Lane jt., 2014). Tegemist on dünaamilise struktuuriga, mis koosneb RVMist, lähedal paiknevatest rakkudest ja nende sekreteeritud faktoritest. Lisaks mõjutavad tüvirakke keskkonna muutused: põletikureaktsioon, fibroos ja maatriksi jäikus. (Lane jt., 2014) Nišši funktsiooniks on tüvirakkude aktivatsiooni, proliferatsiooni ja diferentseerumise reguleerimine (Katoonizadeh ja Poustchi, 2014).

Pikka aega on arvatud, et kroonilise maksakahjustuse järgne regeneratsioon toimub läbi periportaalse tüvi/eellasrakkude aktiveerumise (Stanger, 2015), mistõttu on selles piirkonnas enim uuritud maksa tüviraku nišši ja selle mõju koe taastamisele. Kroonilise kahjustuse toimet tekkivas niššis esinevad müofibroblastid, endoteelirakud ja makrofaagid (Lorenzini jt., 2010). RVMi komponentidest omavad olulist rolli laminiin ja I tüüpi kollageen, mille geeniekspressioon aktiveeritakse pärast kroonilist CDE dieeti regeneratsiooni varajases faasis

(Van Hul jt., 2009; Williams jt., 2014). Kahjustuse järel ümbritseb laminiin tüvi/eellasrakkude portaalalast parenhüümi laienevat populatsiooni ja *in vitro* katsed viitavad, et laminiin on vajalik rakkude vähediferentseerunud oleku säilitamiseks (Lorenzini jt., 2010). *In vivo* on näidatud, et laminiini kihi vähenemine soodustab tüvi/eellasrakkude diferentseerumist hepatotsüütideks (Español-Suñer jt., 2012). Sarnast efekti omab ka rakkude kasvatamine fibronektiinil (Lorenzini jt., 2010). Lisaks ümbritseb kroonilise kahjustuse korral tüvi/eellasrakkude populatsiooni I tüüpi kollageen. Kroonilise CDE dieedi korral tuvastasid Van Hul jt, et tüvi/eellasrakkude aktivatsioonile eelneb portaalalas müofibroblastide hulga suurenemine ja kollageense maatriksi ladestumine, mis näib suunavat rakkude migratsiooni parenhüümi. (Van Hul jt., 2009) RVMi degradatsiooni mõju regeneratsioonile illustreerivad Kallis jt katsed, kus uuriti kroonilise kahjustuse järgset regeneratsiooni kollageenaasi suhtes resistentset I tüüpi kollageeni ekspresseerivas hiires. Nad leidsid, et kollageeni degradatsiooni inhibeerimine vähendab tüvi/eellasrakkude aktivatsiooni ja neid ümbritseva laminiinidest koosneva maatriksi ladestumist. (Kallis jt., 2011) RVMi reorganiseerimine on vajalik koe taastamiseks, kuid kahjustuse kordumisel võib kontroll muutuste üle kaduda ja tekib üleliigse RVMi ladestumine, mis põhjustab maksa fibroosi (Machado ja Diehl, 2014; Pellicoro jt., 2014).

Fibroosi iseloomustab ebanormaalselt suur RVMi valkude süntees ja ladestumine (Neubauer jt., 2001). Põhilised fibrootilise maatriksi moodustajad on kollageenid, mille puhul on täheldatud fibrille moodustavate I, III, V tüüpi kollageenide ja võrgustikku moodustavate IV ja VI tüüpi kollageenide hulga kasvu. Lisaks on tuvastatud fibroosi vältel järk-järgult vitronektiini ekspressiooni suurenemist (Chen jt., 2014) ja hilises faasis elastiini taseme tõusu (Pellicoro jt., 2012). Fibrootilise maksa Disse ruumis ja portaalalas leidub suuremal hulgal IV tüüpi kollageeni ja fibronektiini (Hahn jt., 1980). Kuna RVMi komponente sünteesivad rakud asuvad põhiliselt Disse ruumis, moodustab sinna ladestunud maatriks hepatotsüütide ja verevoolu vahele barjääri, mis takistab maksa funktsioonide läbiviimist (Gressner jt., 2007; Neubauer jt., 2001). Kroonilise kahjustusega kaasnev püsiv põletikureaktsioon ja RVMi valkude ladestumine alandab hepatotsüütide regeneratiivset võimekust ning häirib maksa regeneratsiooni (Forbes ja Rosenthal, 2014). Seevastu akuutse maksakahjustuse järel toimub maksa funktsiooni taastumine (Stanger, 2015), mistõttu võivad sealsed RVMi muutused soodustada regeneratsiooni. Muutuste täpsem kirjeldamine võimaldaks paremini mõista RVMi rolli maksa koe taastamises.

2. EKSPERIMENTAALOSA

Käesolev bakalaureusetöö on osa TÜMRI rakubioloogia õppetoolis Viljar Jaksi töögrupis läbiviidavast uurimustööst (lisa 1), mille käigus uuriti maksakahjustuse korral toimuvaid muutuseid maksa RVMis. Tervete hiirte ja CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustusega hiirte maksad detsellulariseeriti, saadud RVMid homogeniseeriti ning viidi läbi mass-spektromeetria analüüs, mille käigus tuvastati proovide valguline koostis. Võrreldes tervete ja maksakahjustusega proovide valkude ekspressioonitasemeid, tehti kindlaks RVMi komponendid, mille tase oli akuutse maksakahjustuse korral terve maksaga võrreldes märkimisväärselt muutunud.

Proteoomika analüüs näitas, et CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse puhul on võrreldes terve maksaga tunduvalt suurenenud fibronektiini, vitronektiini, OLFM4 ja ARMCX2 ekspressioon. Vähemal määral on tõusnud biglükraani tase. Märkimisväärselt on aga langenud elastiini ja IV tüüpi kollageeni tase.

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on tuvastada

- Kas ja millises piirkonnas on akuutse maksakahjustuse korral toimunud fibronektiini, vitronektiini, biglükraani, OLFM4 ja ARMCX2 ekspressioonitaseme tõus?
- Kas ja millises piirkonnas on akuutse maksakahjustuse korral toimunud elastiini ja IV tüüpi kollageeni ekspressioonitaseme langus?
- Kas RVMi komponentide ekspressioonitaseme ja lokalisatsiooni muutused akuutse maksakahjustuse korral võivad mõjutada kahjustuse järel toimuvat rakkude proliferatsiooni?

Eesmärkide saavutamiseks kasutati RVMi komponentide tuvastamist, kombineerituna erinevate maksarakkude, veresoonte ja proliferatsiooni markeritega, immunfluorestsentsanalüüsi abil terves ja akuutse kahjustusega maksakoes.

2.2. Materjalid ja meetodid

2.2.1. Katseloomad

Katseid teostati 8–10 nädala vanuste CBA hiireliini isaste hiirtega, keda kasvatati TÜMRI vivaariumis. Kõik käesolevas töös kirjeldatud elusate katseloomadega läbiviidud protseduurid

toimused Viljar Jaksile väljastatud loomkatseprojekti loa (lisa 2) alusel ja viidi läbi käesoleva bakalaureusetöö juhendaja Mariliis Klaasi poolt talle väljastatud pädevustunnistuse alusel.

2.2.2. Maksakahjustuse tekitamine ja koeproovide ettevalmistamine

Akuutse maksakahjustuse esile kutsumiseks süstiti hiiri (3 hiirt katsegrupis) intraperitoneaalselt 25%-lises päevalilleõlis lahustatud CCl_4 -ga vastavalt kehamassile 1 ml/kg kohta. 48 tunni möödumisel ohverdati hiired tservikaalse dislokatsiooni teel. Hiirte maksast lõigati koetükk, mis sisestati krüovormis Tissue-Tek® O.C.T™ külmutussegusse (Sakura, JP) ja seejärel külmutati 2-metüülbutaani mahutis, mis oli asetatud vedelasse lämmastikku. Kontrollina kasutati terveid hiiri, kelle maks eemaldati ja külmutati sarnaselt eespool kirjeldatule. Külmutatud koeproovid säilitati -80°C juures.

2.2.3. Koelõikude lõikamine

Edasiseks analüüsimiseks tehti krüotoomiga (Leica, DE) uuritavatest koeproovidest 7 μm paksused külmlõigud, mis asetati alusklaasile (StarFrost, Knittel Glass, DE) ja millel lasti kuivada toatemperatuuril üks tund. Proove hoiustati kuni immunofluorestsentsanalüüsi läbiviimiseni -80°C juures.

2.2.4. Immunofluorestsentsanalüüsis kasutatud antikehad

Maksa RVMi komponentide muutuste uurimiseks viidi läbi immunofluorestsentsanalüüs, kus kasutati antud komponentide vastaseid monoklonaalseid (ingl *monoclonal antibody* – mAb) ja polükloonaalseid (ingl *polyclonal antibody* – pAb) primaarseid antikehi (tabel 1).

Tabel 1. Immunofluorestsentsanalüüsis kasutatud RVMi komponentide vastased primaarsed antikehad.

Antikeha	Kasutatud lahjendus	Tootja; katalooginumber
IV tüüpi kollageen (küülikus valmistatud hiire vastane pAb)	1:200	Abcam, GB; ab6586
Fibronectiin (küülikus valmistatud hiire vastane pAb)	1:200	Abcam, GB; ab2413
Elastiin (küülikus valmistatud hiire vastane pAb)	1:50, 1:100	Abcam, GB; ab21610
Biglukaan (küülikus valmistatud hiire vastane pAb)	1:100	Abcam, GB; ab49701
Vitronektiin (rotis valmistatud hiire vastane mAb)	1:50	R&D Systems, US; MAB38751 (kloon 347317)
OLFM4 (küülikus valmistatud hiire vastane pAb)	1:100	Cloud-Clone Corp., US; PAA162Mu01
ARMCX2 (küülikus valmistatud hiire vastane pAb)	1:100	antibodies-online.com, US; ABIN484589

Uuritavate RVMi valkude lokalisatsiooni täpsemaks kirjeldamiseks maksakoes kasutati täiendavalt rakkude proliferatiivsusmarkeri Ki-67, veresoonte markeri alfa silelihase aktiini (ingl *alfa smooth muscle actin* – α SMA), hematopoeetiliste rakkude markeri CD45, hepatotsüütide markeri HNF4 α ja MUPi, BECide markeri CK19 ja mesenhümaalsete rakkude markeri desmiini vastaseid primaarseid mono- ja polükлонаalseid antikehi (tabel 2).

Tabel 2. Immunofluorestsentsanalüüsis kasutatud lisamarkerite vastased primaarsed antikehad.

Antikeha	Kasutatud lahjendus	Tootja; katalooginumber
HNF4 α (kitses valmistatud hiire vastane pAb)	1:200	Santa Cruz Biotechnology, US; sc-6556
MUP (kitses valmistatud hiire vastane pAb)	1:200	Nordic-MUBio, NL; GAM/MUP
CK19 (rotis valmistatud hiire vastase antikeha supernatant)	1:1	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, US; Trooma-III-g
Ki-67 (rotis valmistatud hiire vastane mAb)	1:200	eBioscience, US; 14-5698 (kloon: SolA15)
Ki-67 (küülikus valmistatud hiire vastane mAb)	1:100	Spring Bioscience, US; M3060 (kloon: SP6)
Desmiin (hiires valmistatud inimese/hiire vastane mAb)	1:200	Dako Denmark, DK; M0760 (kloon: D33)
Desmiin (kitses valmistatud hiire vastane pAb)	1:25, 1:50	R&D Systems, US; AF3844
α SMA (hiires valmistatud hiire vastane mAb)	1:25	Leica microsystems, DE; NCL-SMA (kloon: asm-1)
CD45 (rotis valmistatud hiire vastane mAb, konjugeeritud fukoerütriiniga)	1:500	eBioscience, US; 12-0451 (kloon 30-F11)

Primaarsete antikehade seostumise visualiseerimiseks fluorestsentsmikroskoobiga kasutati primaarsetele antikehadele vastavaid fluorokroomiga konjugeeritud sekundaarseid antikehi (tabel 3).

Tabel 3. Immunofluorestsentsanalüüsis kasutatud sekundaarsed antikehad.

Antikeha	Kasutatud lahjendus	Tootja; katalooginumber
Kanas valmistatud küüliku vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 488	1:1000	Life technologies, US; A-21441
Eeslis valmistatud küüliku vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 647	1:1000	Life technologies, US; A-31573
Eeslis valmistatud roti vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 594	1:1000	Life technologies, US; A-21209
Kitses valmistatud roti vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 488	1:1000	Life technologies, US; A-11006

Tabel 3 järg. Immunofluorestsentsanalüüsis kasutatud sekundaarsed antikehad.

Antikeha	Kasutatud lahjendus	Tootja;katalooginumber
Kitses valmistatud roti vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 647	1:400	Jackson ImmunoResearch, US; 712-606-153
Kanas valmistatud kitse vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 647	1:1000	Life technologies, US; A-21469
Eeslis valmistatud kitse vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 488	1:1000	Life technologies, US; A-11055
Kanas valmistatud hiire vastane pAb, konjugeeritud fluorokroomiga Alexa 647	1:1000	Life technologies, US; A-21463

Iga uuritava RVMi komponendi vastase primaarse antikehaga viidi läbi immunofluorestsentsanalüüs vähemalt kahel korral kahelt erinevalt hiirelt pärinevatel koeproovidel.

2.2.5. Immunofluorestsentsanalüüs

Kõik järgnevalt toodud protseduurid viidi läbi toatemperatuuril, kui pole märgitud teisti. Immunofluorestsentsanalüüsi läbiviimiseks fikseeriti eelnevalt 10–15 minutit toatemperatuuril hoitud külmlõike 10 minuti jooksul 4% paraformaldehüüdi lahusega. Fikseeritud lõike pesti kaks korda kolm minutit fosfaatpuhverdatud soolalahuses (ingl *phosphate buffered saline* – PBS). Seejärel permeabiliseeriti proove 10 minutit 0,1% Triton X-100 lahusega PBSs ja pesti kaks korda kolm minutit PBSs. Antikeha mittespetsiifilise seostumise vältimiseks inkubeeriti proove üks tund blokeerimislahusega, milleks kasutati 5% eesli seerumit lahjendatuna PBSs. Hiire valmistatud primaarsete antikehade kasutamisel lisati blokeerimislahusele Vector® M.O.M.TM (Vector Laboratories, US) immunodetekterimiskomplekti blokeerimisreagenti vastavalt tootja protokollile. Järgnevalt pesti proove kaks korda kolm minutit PBSs. Hiire valmistatud primaarsete antikehade kasutamisel inkubeeriti lõike täiendavalt viis minutit M.O.M.TM lahjenduslahuses järgides tootja protokollit. Lõikudele lisati blokeerimislahuses või M.O.M.TM lahjenduslahuses lahjendatud primaarne antikeha ja proove hoiti üleöö niisutuskambris 4°C juures. Järgmisel päeval pesti lõike kolm korda viis minutit PBSs, misjärel lisati lõikudele sekundaarne antikeha lahjendatuna blokeerimislahuses või M.O.M.TM lahjenduslahuses. Sekundaarse antikeha lahust hoiti proovidel ühe tunni vältel ja seejärel pesti proove kolm korda viis minutit PBSs. Vajadusel inkubeeriti proove ühe tunni jooksul blokeerimislahuses lahjendatud fukoerütriiniga konjugeeritud primaarse antikehaga, misjärel pesti proove kolm korda viis minutit PBSs. Rakutuumade visualiseerimiseks inkubeeriti proove

kaks minutit PBSs lahjendatud 4',6-diamidino-2-fenüülindooliga (ingl *4',6-diamidino-2-phenylindole* – DAPI) (Sigma-Aldrich, US, katalooginumber D9542; lõppkontsentratsioon 0,1µg/ml) ja pesti kolm korda kolm minutit PBSs. Lõigud sulundati kasutades Dako fluorestsentssulundusvedelikku (Dako Denmark, DK) ja säilitati 4°C juures.

2.2.6. Fluorestsentsmikroskoopia

Koelõike, millega teostati immunofluorestsentsanalüüs, vaadeldi fluorestsentsmikroskoop Olympus IX81 CellRga (Olympus, JP) ja pildid jäädvustati Hamamatsu Orca ER (Hamamatsu Photonics, DE) kaameraga, kasutades 10x, 40x või 100x suurendusega objektiivi. Mikroskoopia tulemusena saadud pildid töödeldi Hokawo 2.1 pilditöötlusprogrammiga (Hamamatsu Photonics, DE).

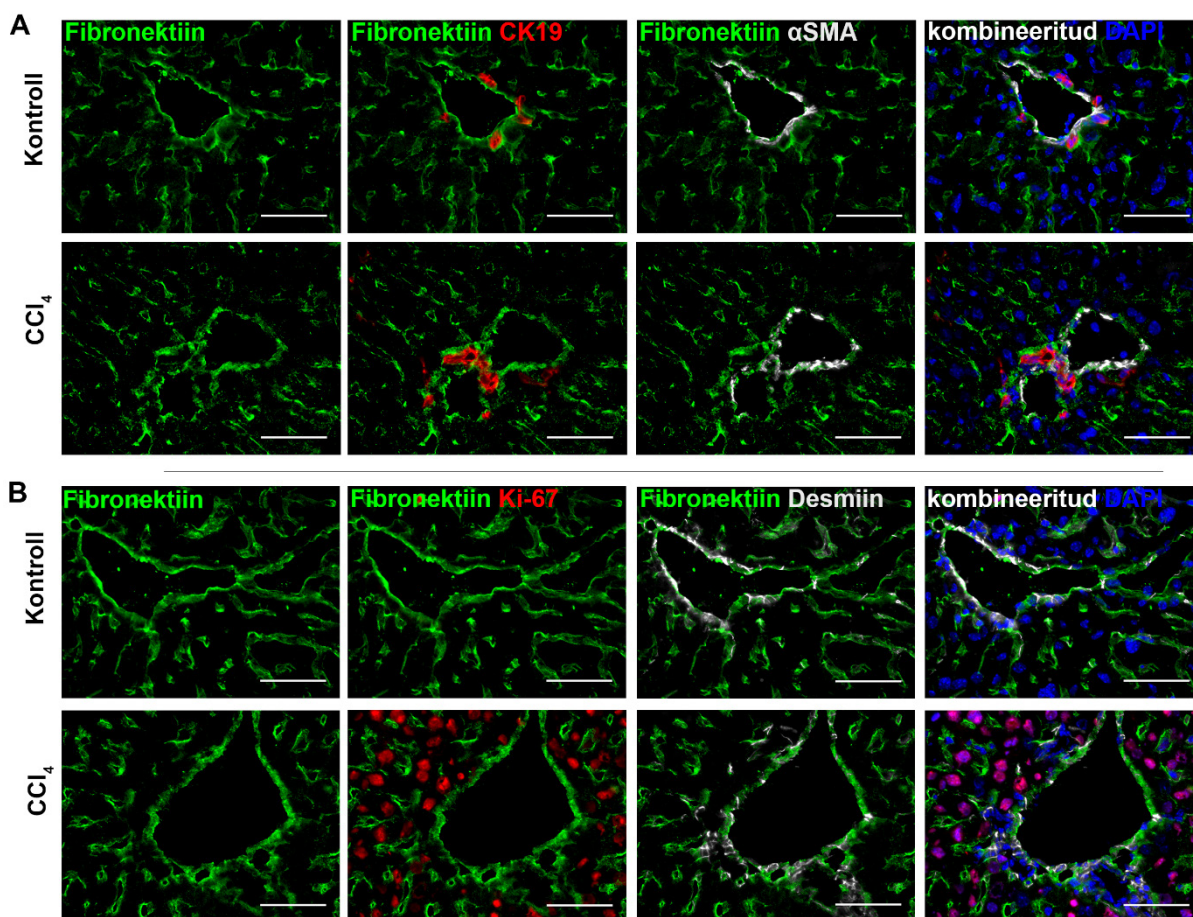
2.3. Tulemused

Maksa regeneratsioonis on tähtis roll maksa RVMi koostise muutusel ja komponentide reorganiseerimisel (Williams jt., 2014). Akuutse maksakahjustuse põhjustatud RVMi komponentide muutuste kirjeldamiseks võrreldi käesolevas bakalaureusetöös immunofluorestsentsanalüüsi abil tervete ja akuutse maksakahjustusega hiirte koeproove. Võrdluse eesmärgiks oli tuvastada RVMi komponentide ekspressioonitaseme ja lokalisatsiooni muutused ning nende mõju kahjustuse järel toimuvale rakkude proliferatsioonile.

Hiirtele põhjustati maksakahjustus hepatotoksilise CCl₄-ga, mille aktiveerivad organismis peritsentraalsetes hepatotsüütides ekspresseeritavad P450 ensüümid (Starkel ja Leclercq, 2011). 48 h pärast ühekordset CCl₄ doosi on tuvastatav peritsentraalsete hepatotsüütide nekroos, samas kui portaalala ümbritsevad rakud kahjustunud ei ole (Malato jt., 2011). Uuritavate maksa RVMi komponentide täpse lokalisatsiooni kirjeldamisel maksakoes lähtuti komponentide paiknemisest veresoonte ja erinevate rakutüüpide suhtes. Hepatotsüüdid tuvastati HNF4α ja MUPi, hematopoeetilised rakud CD45, BECid CK19 ja hepaatilised tähtrakud desmiini ekspressiooni kaudu. Lisaks võimaldas αSMA ekspressioon tuvastada sagarikus paiknevate veresoonte harud. (Malato jt., 2011; Mederacke jt., 2013; Schaub jt., 2014; Shin jt., 2011) Hindamaks, kas uuritava RVMi komponendi ekspressioon mõjutab maksakahjustuse järgset rakkude proliferatsiooni, tuvastati prolifereeruvad rakud Ki-67-antigeeni kaudu (Yanger jt., 2014).

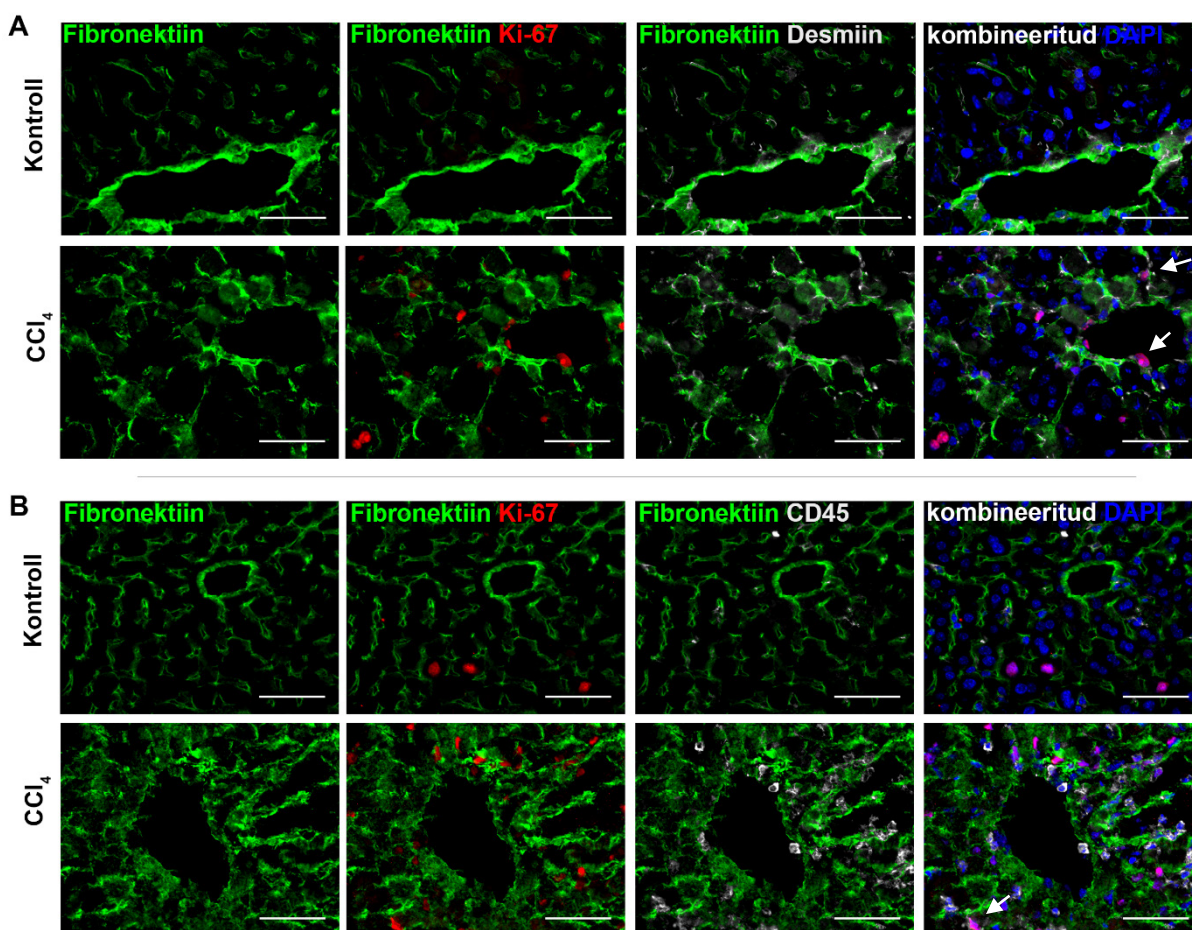
2.3.1. RVMi ülesreguleeritud põhikomponendid: fibronektiin ja biglükään

Fibronektiini ekspressioonitaseme ja lokalisatsiooni tuvastamiseks maksakoes, kasutati immunofluorestsentsanalüüsis fibronektiini, CK19, desmiini, α SMA, Ki-67 ja CD45 vastaseid antikehi (joonised 2 ja 3). Kahjustamata kontrollmaksas tuvastati fibronektiini ekspressioon veresoonte ümber, kus see paiknes veresoonte markeri α SMA ligidal, ja sinusoidides. Lisaks ümbritses fibronektiin CK19 markerit omavaid BECe. Desmiin-positiivsete tähttrakkudega esines kattuvust nii sinusoidides kui ka veresoonte ümbruses. CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse korral oli fibronektiini paiknemine sarnane kontrollmaksaga, kuid tsentaalveeni ümbruses oli valgu ekspressioonitase tõusnud ja ei paiknenud enam konkreetselt sinusoidides, vaid hajusamalt (joonis 3).



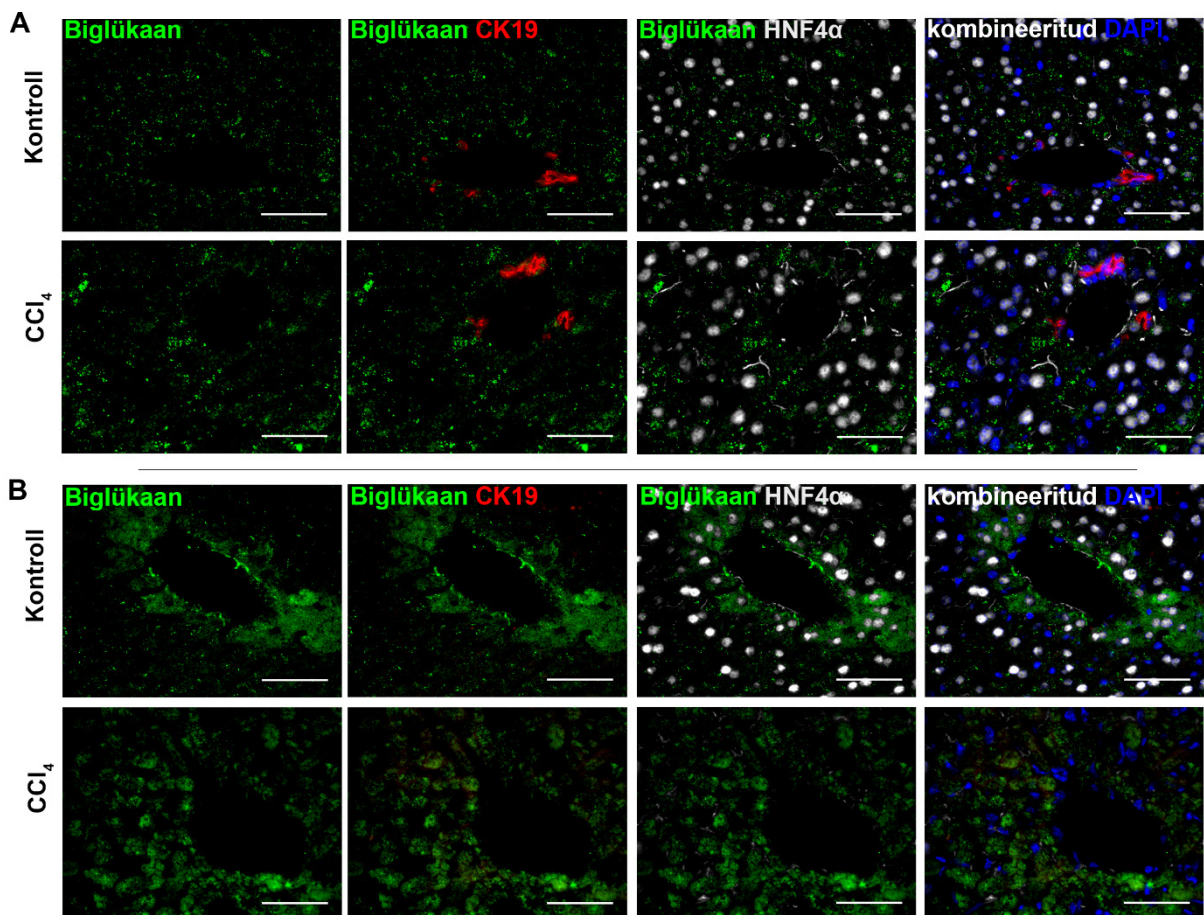
Joonis 2. Fibronektiini ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Portaalas tuvastati fibronektiini, biliaarsete epiteelirakkude markeri CK19 ja veresoonte markeri α SMA signaal (A) ning fibronektiini, rakkude proliferatiivsusmarkeri Ki-67 ja tähttrakkude markeri desmiini signaal (B). Rakutuumad märgistati DAPIga. Mõõtkava vastab 50 μ m-le.

Fibronексиini mõju rakkude proliferatiivsusele hinnati läbi Ki-67-antigeeni ekspressiooni (joonis 2, B ja joonis 3). Kontrollis esines üksikuid Ki-67-positiivseid rakke, kuid kahjustuse korral oli proliferatsioon rakkude tase tõusnud ja neid leidis rohkesti portaalas (joonis 2, B). Hilisemad katsed selles uurimistöös viitavad, et tegemist on proliferatsioon hepatotsüütidega (joonised 5 ja 6). Tsentraalveeni ümber, mis on kahjustusest enim mõjutatud piirkond, esines üksikuid proliferatsioon rakkude, mille tuumad erinesid kujult portaalas leiduvatest. Nende rakkude päritolu määramiseks viidi läbi katsed tähtsate markeri desmiini ja hematopoeetiliste rakkude markeri CD45ga. Mõlema markeri puhul tuvastati osaline kokkulangevus Ki-67 signaali omavate rakutuumadega (joonis 3). Järelikult proliferatsioon suurenenud fibronексиini tasemega kahjustunud piirkonnas tähtsate ning hematopoeetilist päritolu rakud.



Joonis 3. Fibronексиini ekspressiooni ja lokaliseerimise võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Tsentraalveeni ümbruses tuvastati fibronексиini, rakkude proliferatiivsuse markeri Ki-67 ja tähtsate markeri desmiini signaal (A) ning fibronексиini, rakkude proliferatiivsuse markeri Ki-67 ja hematopoeetiliste rakkude markeri CD45 signaal (B). Rakutuumad märgistati DAPI-ga. Nööled viitavad Ki-67 kolokalisatsioonile desmiini (A) ja CD45-ga (B). Mõõtkava vastab 50 µm-le.

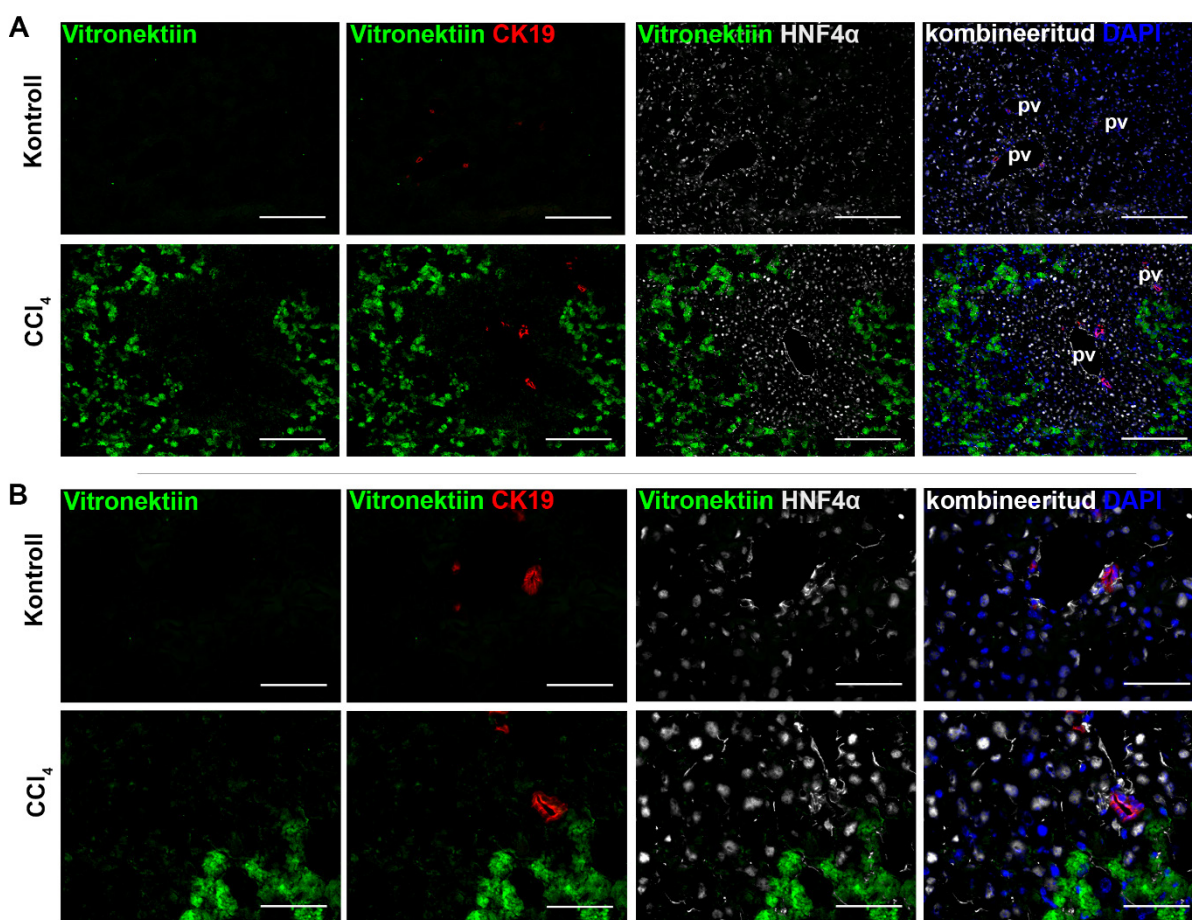
Teiseks RVMi suurenevaks põhikomponendiks oli biglukaan, mille ekspressioonitaseme ja lokalisatsiooni uurimiseks kasutati immunofluorestsentsanalüüsis lisamarkeritena HNF4 α ja CK19 vastaseid antikehi (joonis 4). Biglukaan esines kahjustamata kontrollmaksas väikeste täppidena hajusalt ja paiguti kokku koondunult. CK19 või HNF4 α signaaliga otsest ühtelangevust ei esinenud, küll aga paiknes biglukaan nende vahetus läheduses. Tsentraalveeni ümber esines valku lisaks täppidele ka ühtlasemate ja hajusamate piirkondadena. Portaalarlas esines täppe rohkem kui tsentraalveeni ümber. Akuutse maksakahjustuse korral paiknes biglukaan sarnaselt kontrolliga portaalarlas täppidena, mis ei kattunud otseselt HNF4 α ja CK19ga. Kontrolli ja kahjustunud maksa võrdlemisel ei olnud võimalik tuvastada, et täppide esinemine portaalarlas oleks märkimisväärselt tõusnud (joonis 4, A). Tsentraalveeni ümber oli biglukaani ekspressioon muutunud: valk ei paiknenud ühtlase ja hajusa alana, vaid selgelt piirdunult (joonis 4, B).



Joonis 4. Biglukaani ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Biglukaani, biliarsete epiteelirakkude markeri CK19 ja hepatotsüütide markeri HNF4 α signaal tuvastati portaalarlas (A) ja tsentraalveeni ümbruses (B). Rakutuomad märgistati DAPIga. Mõõtkava vastab 50 μ m-le.

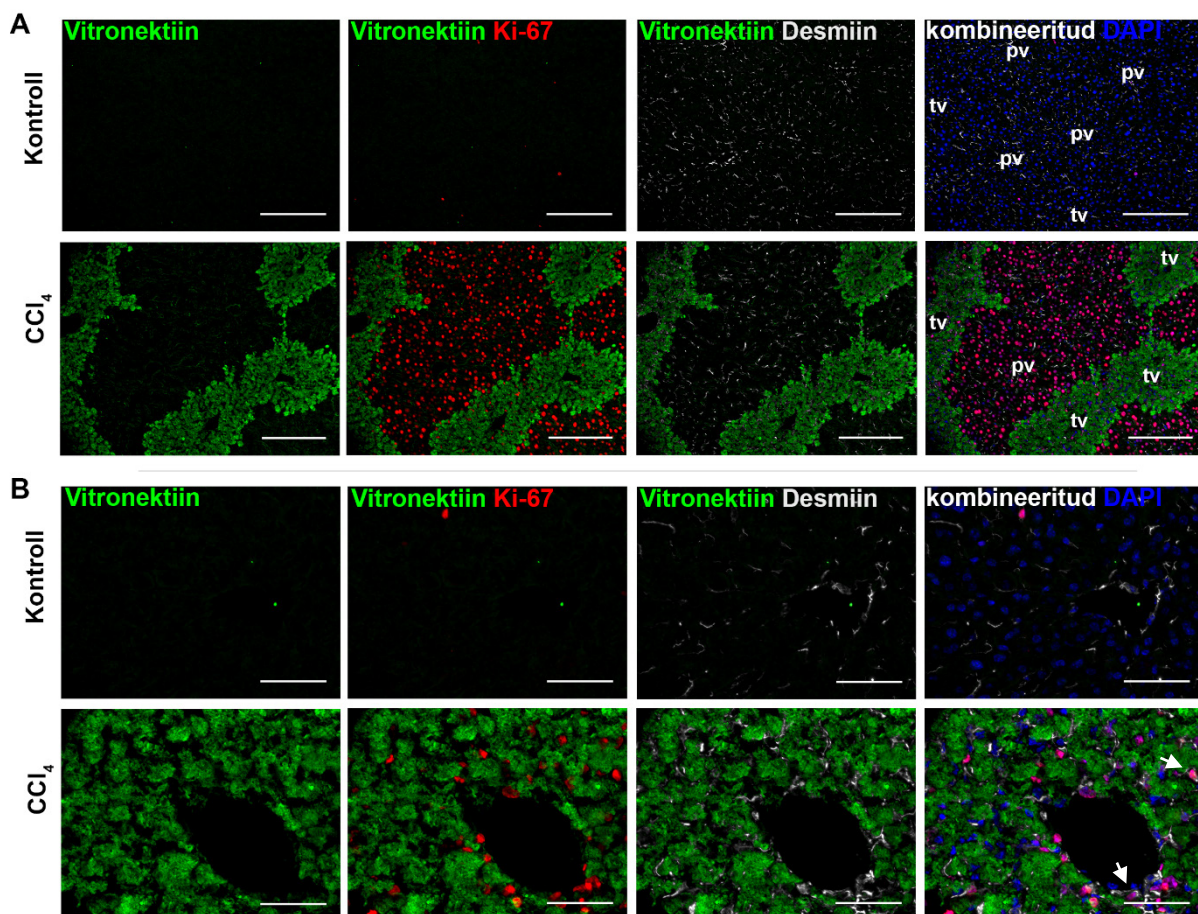
2.3.2. RVMi ülesreguleeritud regulatiivsed komponendid: vitronektiin, ARM CX2 ja OLFM4

Vitronektiini kirjeldamiseks maksakoes viidi läbi immunofluorestsentsanalüüs, mille käigus lisaks vitronektiinile kasutati HNF4 α , MUPi, CK19, desmiini, ja Ki-67 vastaseid antikehi (joonised 5, 6 ja 7). Kahjustamata kontrollmaksas vitronektiini signaali ei tuvastatud, kuid CCl₄-ga kahjustatud maksas tekkis tsentraalveeni ümbruses vitronektiini sisaldav piirkond, mis laienes osaliselt ka sagariku keskossa. Selles piirkonnas ei esinenud HNF4 α ega CK19 signaali (joonis 5), küll aga leidis tsentraalveeni ümber desmiin-positiivseid tähtrake, kuid nende otsest ühtelangevust vitronektiiniga ei tuvastatud (joonis 6). Portaalas ja osaliselt sagariku keskosas, kus olid HNF4 α ekspresseerivad hepatotsüüdid, tuvastati nõrk vitronektiini signaal sinusoidides (joonis 6, A).



Joonis 5. Vitronektiini ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Vitronektiini, biliaarsete epiteelirakkude markeri CK19 ja hepatotsüütide markeri HNF4 α signaal tuvastati maksakoes (A) ja portaalas (B). Rakutuumad märgistati DAPIga. Paneelil A on märgistatud portaalveenid (pv). Mõõtkava vastab 200 μ m-le (A) ja 50 μ m-le (B).

Selgitamaks välja, kas tsentraalveeni ümbritsev vitronektiin võib soodustada lähedal paiknevate rakkude proliferatsiooni, uuriti selles piirkonnas Ki-67-antigeeni abil proliferatuurivate rakkude esinemist (joonis 6). Kontrollmaksas leiti üksikuid Ki-67 ekspresseerivaid rakke, kuid pärast kahjustust nende tase tõusis. Tsentraalveeni ümbritsevas alas olevad proliferatuurivad rakud ei langenud otseselt kokku vitronektiiniga, kuid kattusid osaliselt desmiini ekspresseerivate tähtrakkudega. Tuginedes eelnevalt läbiviidud katsetele, võib eeldada, et osa ülejäänud Ki-67-positiivsetest rakutuumadest kuuluvad hematopoeetilistele rakkudele (joonis 3, B).

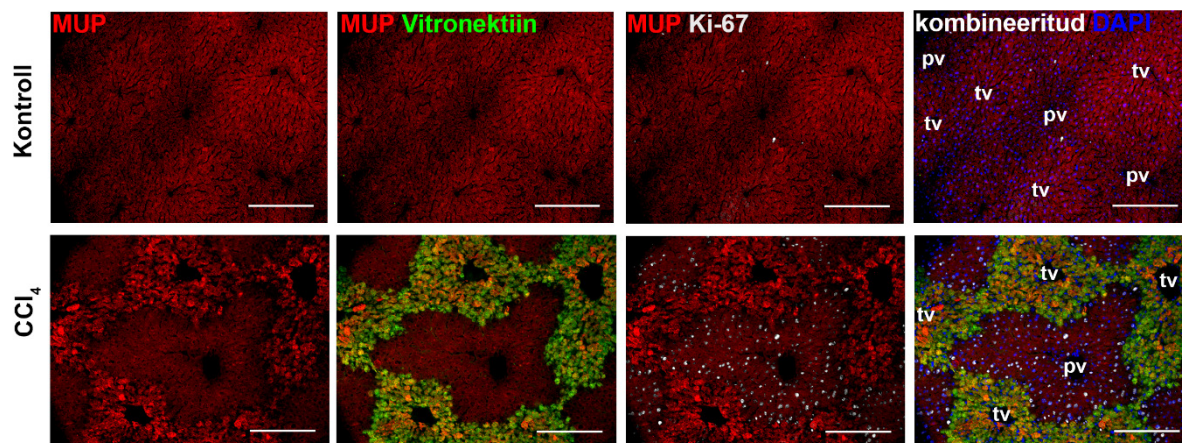


Joonis 6. Vitronektiini ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Vitronektiini, rakkude proliferatiivsusmarkeri Ki-67 ja tähtrakkude markeri desmiini signaal tuvastati maksakoes (A) ja tsentraalveeni ümbruses (B). Rakutuumad märgistati DAPIga. Paneelil A on märgistatud portaalveenid (pv) ja tsentraalveenid (tv). Paneelil B viitavad nooled Ki-67 kolokalisatsioonile desmiiniga. Mõõtkava vastab 200 µm-le (A) ja 50 µm-le (B).

Vitronectiin-positiivne ala joonisel 6 on ühtlasem ja hajusam, kui joonisel 5, mis tuleneb asjaolust, et tegemist on erinevatelt hiirtelt pärinevate koeproovidega.

Hepatotsüütide markeri HNF4α vastase antikehaga märgistamisel ei tuvastatud antikeha spetsiifilist signaali CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse korral tekkivas vitronektiin-positiivses alas (joonis 5). Selgitamaks, kas antud piirkonnas esineb hepatotsüüte, otsustati

kasutada märgistamiseks alternatiivse markerina MUPi (joonis 7). Kahjustamata kontrollmaksas tuvastati MUPi ekspressioon kogu maksa parenhüümi ulatuses. CCl₄-ga kahjustatud maksas ekspresseerus MUP portaalala ümbruses ühtlaselt. Tsentraalveeni lähistel, kus esines vitronektiin-positiivne ala, leidis nii intensiivse MUPi signaaliga piirkondi kui ka nõrgalt positiivseid alasid. See viitab, et tsentraalveeni ümbritsevas vitronektiin-positiivses alas paiknevad hepatotsüüdid, mis ekspresseerivad MUPi, kuid on kaotanud kahjustuse tõttu HNF4α signaali.

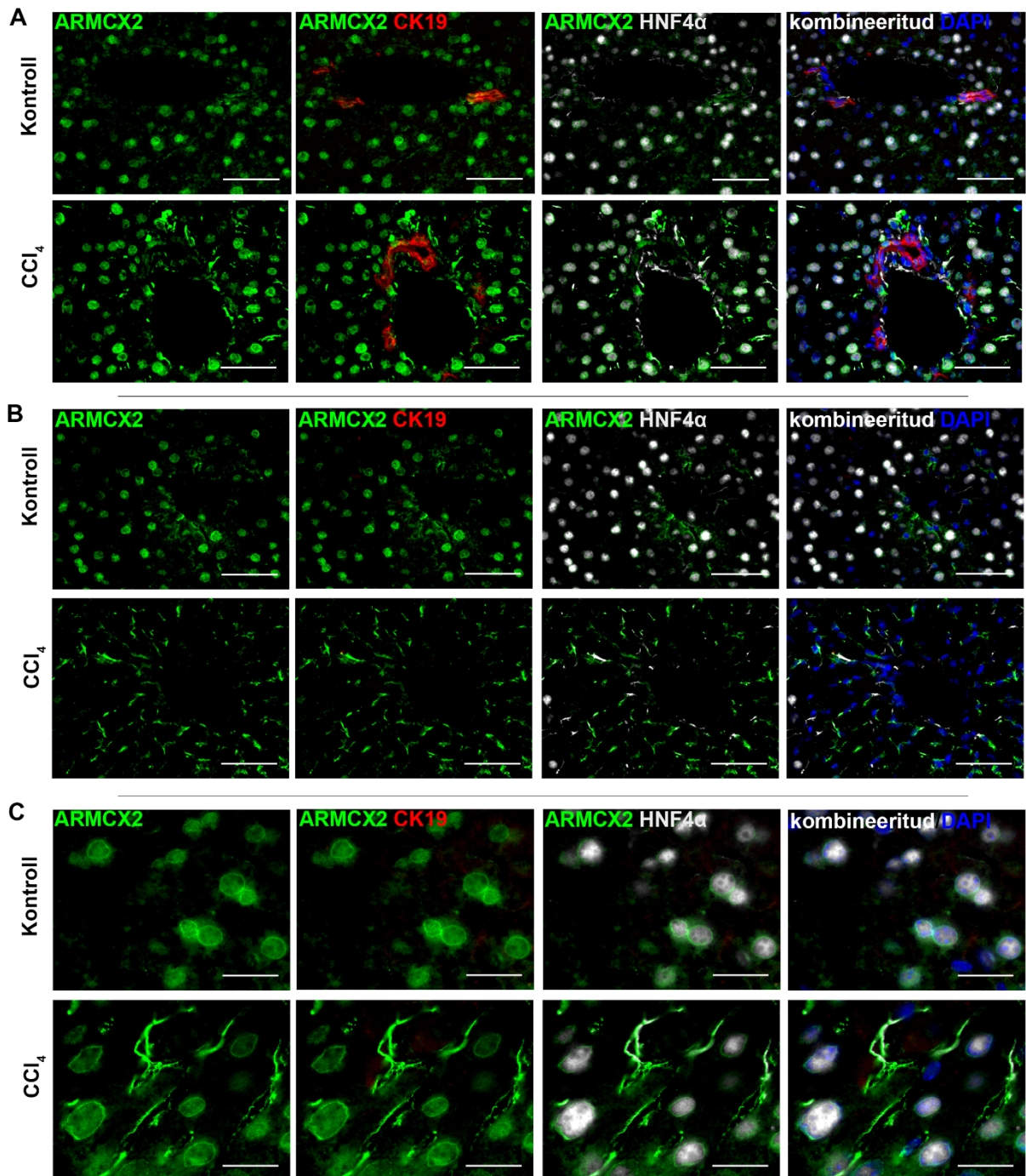


Joonis 7. Vitronektiini ja hepatotsüütide markeri peamise uriini valgu (MUPi) kolokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Vitronektiini, hepatotsüütide markeri MUPi ja rakkude proliferatiivsuse markeri Ki-67 signaal tuvastati maksakoes. Rakutuumad märgistati DAPIga. Joonisel on märgistatud portaalveenid (pv) ja tsentraalveenid (tv). Mõõtkava vastab 200 µm-le.

ARMCX2 lokaliseerimise ja ekspressiooni täpsemaks kirjeldamiseks kasutati immunofluorestsentsanalüüsis ARM CX2, HNF4α ja CK19 vastaseid antikehi (joonis 8). Kahjustamata kontrollmaksas tuvastati üle kogu sagariku ARM CX2-positiivsed rakutuumad, mis langesid kokku HNF4α markerit omavate hepatotsüütidega. Kohati esines kattuvust CK19 signaaliga. CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse korral leiti portaalas sarnaselt kontrollile ARM CX2 ekspresseerivad hepatotsüüdid (joonis 8, A), kuid sellised rakud puudusid tsentraalveeni lähistel (joonis 8, B). Lisaks oli suurenenud ekspressioon portaalala ümbritsevas koes. Tsentraalveeni ümbruses leidis ARM CX2 signaal sinusoidide juures, mis võrdlusele käesoleva töö tulemustega, viis järelduseni, et tegemist võib olla desmiini ekspresseerivate tähtrakkudega (joonis 6, B).

Koelõike vaadeldi mikroskoobi 100x suurendusega, et täpsemalt kirjeldada ARM CX2 signaali esinemist rakutuumades ja sinusoidide lähistel (joonis 8, C). Selgus, et rakutuumades esineb

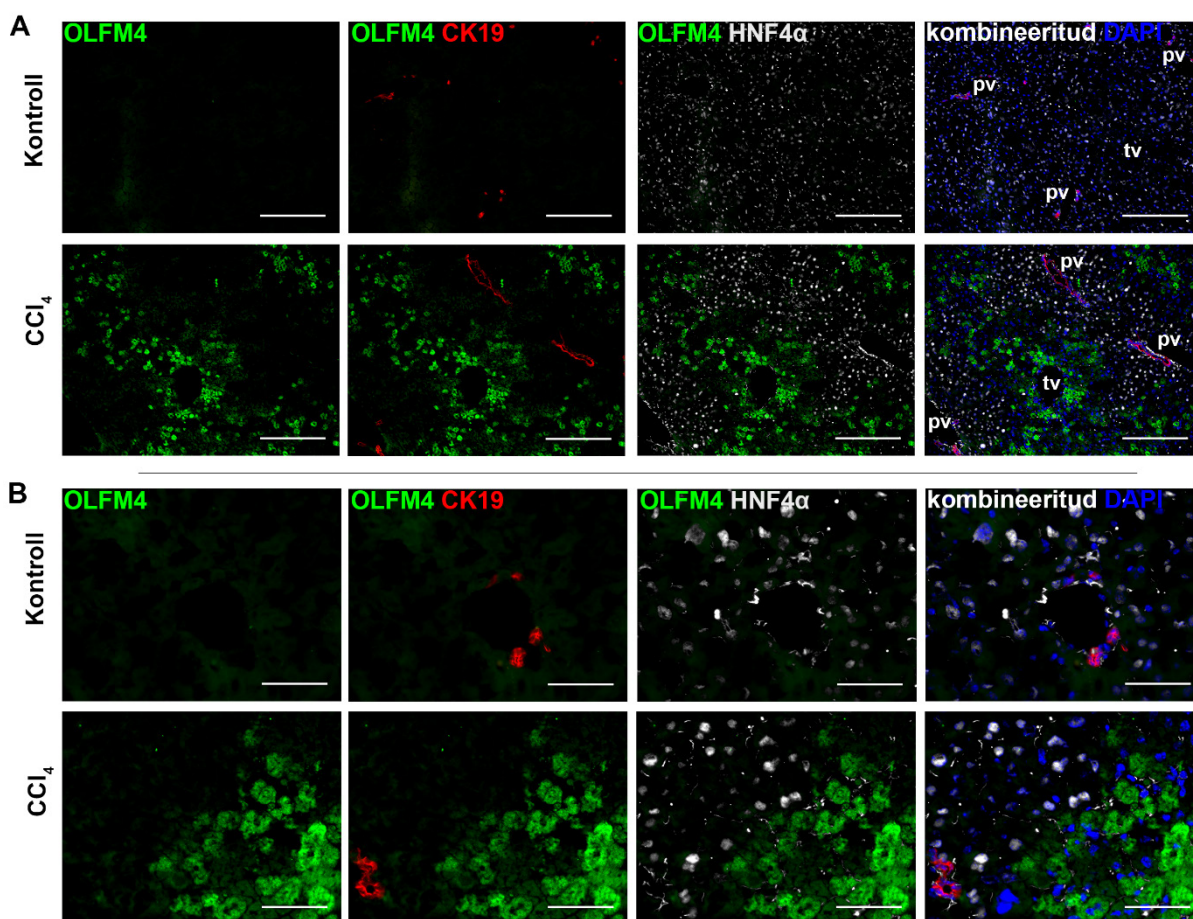
ühtlane ARM CX2 ekspressioon, mis intensiivistub tuumamembraanis. Samuti oli näha ARM CX2-positiivseid arvatavaid tähtrakke.



Joonis 8. Armadillo kordust sisaldava X seoselise valk 2 (ARM CX2) ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. ARM CX2, biliaarsete epiteelirakkude markeri CK19 ja hepatotsüütide markeri HNF4α signaal tuvastati portaalalas (A), tsentraalveeni ümbruses (B) ja maksakoos (C). Rakutuumad märgistati DAPIga. Mõõtkava vastab 50 µm-le (A, B) ja 20 µm-le (C).

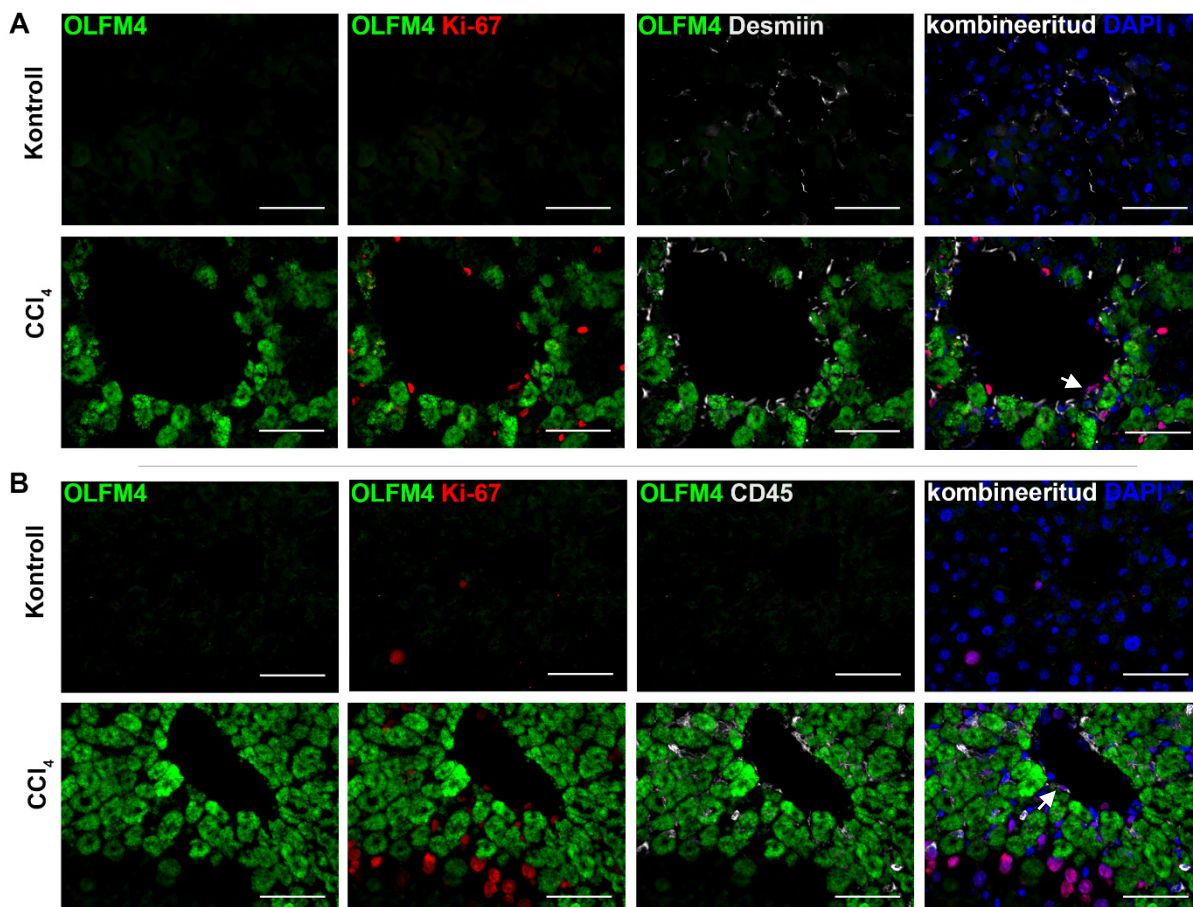
ARMCX2 kolokalisatsiooni rakkude proliferatiivsusmarkeri Ki-67 ei vaadeldud, kuid selle uurimustöö eelnevad tulemused viitavad, et CCl₄-ga kahjustatud maksas moodustavad suurima proliferatsioonivõimega rakkude populatsiooni portaalarveeni lähedal paiknevad hepatotsüüdid (joonised 5 ja 6), mis ekspresseerivad ka ARMX2 (joonis 8, A).

OLFM4 lokaliseerimise ja ekspressioonitaseme muutuste uurimiseks akuutse maksakahjustuse puhul kasutati immunofluorestsentsanalüüsi OLFM4, HNF4α, MUPi, CK19, desmiini, Ki-67 ja CD45 vastaseid antikehi (joonised 9, 10 ja 11). Kahjustamata kontrollmaksas OLFM4 signaali ei tuvastatud. CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse korral tekkis tsentraalveeni ümber OLFM4-positiivne piirkond, kus puudus hepatotsüütides HNF4α markeri ekspressioon (joonis 9). Antud piirkonnas esines desmiin-positiivseid tähtrake, kuid puudus nende otsene kattumine OLFM4ga (joonis 10, A). Portaalarveeni lähedal, kus esines HNF4α ja CK19 signaal, OLFM4 ei tuvastatud (joonis 9).



Joonis 9. Olfaktomediin-4 (OLFM4) ekspressiooni ja lokaliseerimise võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. OLFM4, biliarsete epiteelirakkude markeri CK19 ja hepatotsüütide markeri HNF4α signaal tuvastati maksakoes (A) ja portaalarveeni lähedal (B). Paneelil A on märgistatud portaalarveenid (pv) ja tsentraalveenid (tv). Rakutuomad märgistati DAPIga. Mõõtkava vastab 200 µm-le (A) ja 50 µm-le (B).

Selleks, et hinnata OLFM4 mõju rakkude proliferatsioonile, uuriti OLFM4-positiivses alas Ki-67-antigeeni esinemist (joonis 10). Tsentraalveeni ümbruses leidis OLFM4-positiivsete alade vahepeal Ki-67 ekspresseerivaid rakke, mille päritolu kindlaks tegemiseks viidi läbi katsed desmiini ja CD45-antigeeni vastaste antikehadega. Selgus, et tsentraalveeni ümbritsevate proliferatsioonirakkude seas on nii desmiini ekspresseerivaid tähtrakke (joonis 10, A) kui ka CD45 markeriga hematopoeetilisi rakke (joonis 10, B).

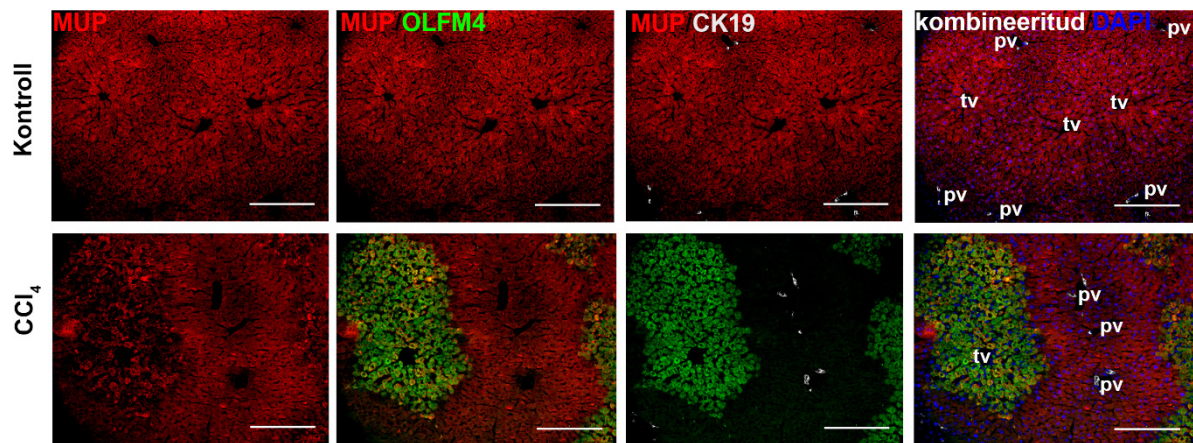


Joonis 10. Olfaktomediin-4 (OLFM4) ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Tsentraalveeni ümbruses tuvastati OLFM4, rakkude proliferatiivsusmarkeri Ki-67 ja tähtrakkude markeri desmiini signaal (**A**) ning OLFM4, rakkude proliferatiivsusmarkeri Ki-67 ja hematopoeetiliste rakkude markeri CD45 signaal (**B**). Rakutuumad märgistati DAPIga. Nooled viitavad Ki-67 kolokalisatsioonile desmiiniga (**A**) ja CD45-ga (**B**). Mõõtkava vastab 50 μm-le.

OLFM4-positiivne ala joonisel 10 on ühtlasem ja hajusam, kui joonisel 9, mis tuleneb asjaolust, et tegemist on erinevatelt hiirtelt pärinevate koeproovidega.

CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse korral tekkivas OLFM4-positiivses alas puudus hepatotsüütides HNF4α signaal, mistõttu viidi katsed läbi alternatiivse hepatotsüütide markeri MUPiga (joonis 11). Kontrollmaksas tuvastati MUPi ekspressioon ühtlaselt üle kogu maksa

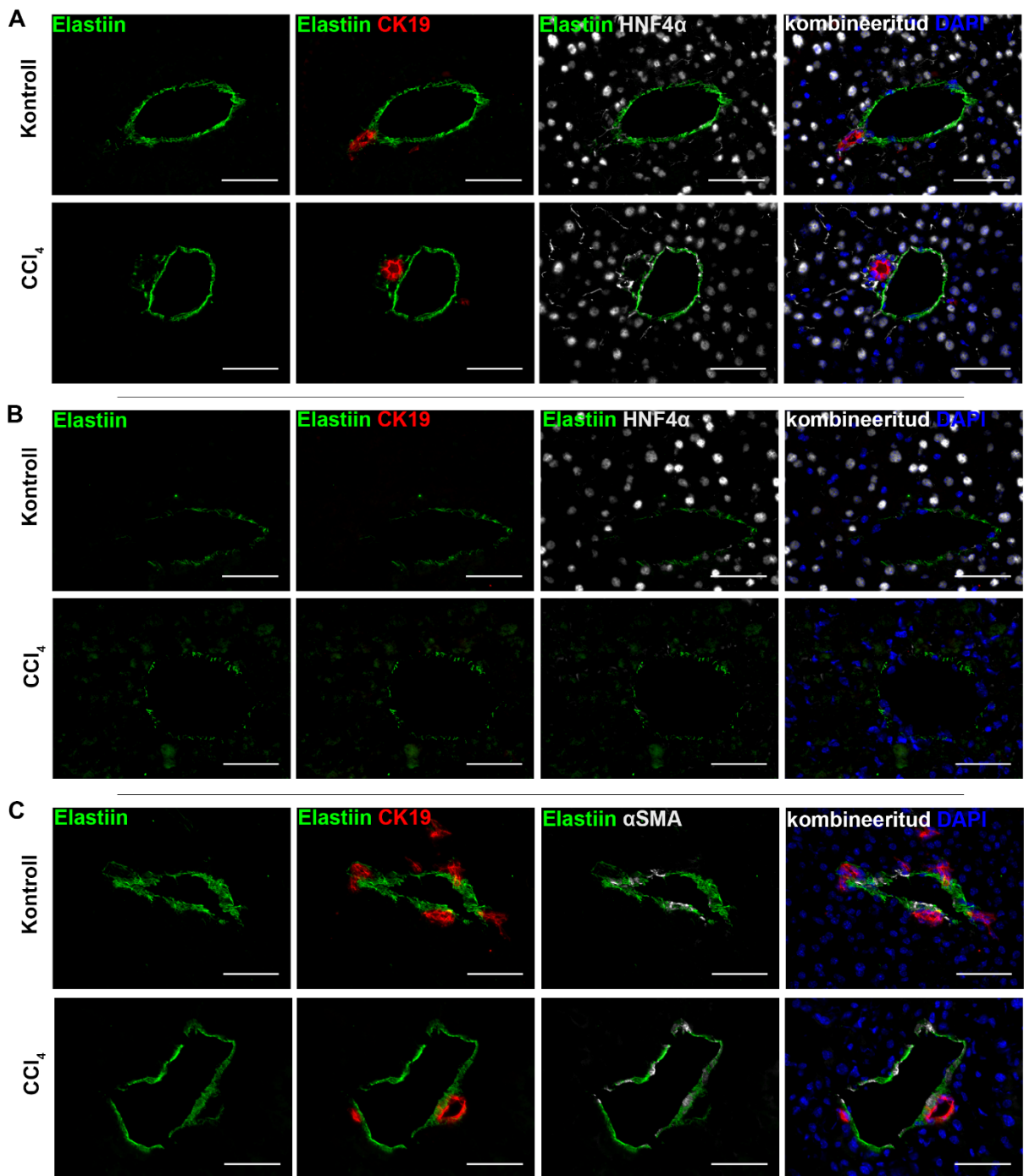
parenhüümi. Kahjustuse järel oli markeri ekspressioon portaalas sarnane kontrollile, kuid tsentraalveeni ümber, kus esines OLFM4 ekspressioon, tuvastati nii intensiivsema signaaliga kui ka nõrgemalt värvunud alasid. Järelikult on pärast akuutset maksakahjustust hepatotsüüdid kaotanud HNF4 α signaali, kuid on säilinud MUPi ekspressioon.



Joonis 11. Olfaktomediin-4 (OLFM4) ja hepatotsüütide markeri peamise uriini valgu (MUPi) kolokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. OLFM4, hepatotsüütide markeri MUPi ja biliaarsete epiteelirakkude markeri CK19 signaal tuvastati maksakoes. Rakutuomad märgistati DAPIga. Joonisel on märgistatud portaalveenid (pv) ja tsentraalveenid (tv). Mõõtkava vastab 200 μ m-le.

2.3.3. RVMi allareguleeritud põhikomponendid: elastiin ja IV tüüpi kollageen

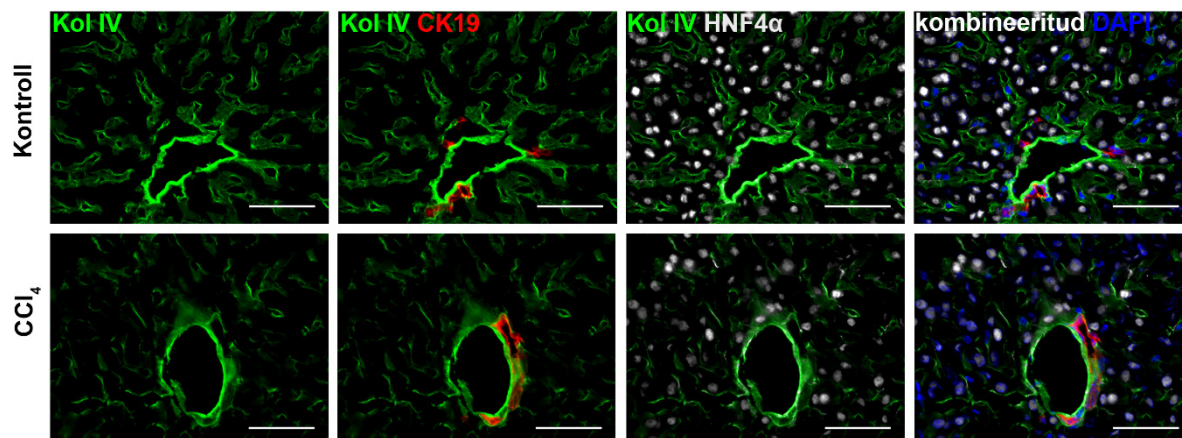
Elastiinkiudude komponendi elastiini (Wise ja Weiss, 2009) lokaliseerimise ja ekspressiooni uurimiseks maksakoes kasutati immunofluorestsentsanalüüsi elastiini, HNF4 α , CK19 ja α SMA vastaseid antikehi (joonis 12). Kahjustamata kontrollmaksas ümbritses elastiin portaalveeni, kus oli eristatav valgu kiuline paiknemine. CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse korral oli valgu ekspressioon samas piirkonnas kitsam ja kontsentreeritum (joonis 12, A). Peale selle leidis elastiini õrnalt ja katkendlikult tsentraalveeni ümber, kus ekspressioonitase oli kahjustuse korral nõrgem kui kontrollis (joonis 12, B). Hepatotsüütide markeri HNF4 α ja BECe iseloomustava CK19 signaaliga olulist kattumist ei täheldatud (joonis 12, A ja B), kuid elastiini paiknes veresoonte markeri α SMA ligikal (joonis 12, C). Kuna elastiini ekspressioon oli iseloomulik suurematele veresoontele, mitte maksa parenhüümile, ei uuritud elastiini mõju kahjustuse järel toimuvale rakkude proliferatsioonile.



Joonis 12. Elastini ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Elastini, biliaarsete epiteelirakkude markeri CK19 ja hepatotsüütide markeri HNF4 α signaal tuvastati portaallalas (A) ja tsentraalveeni ümbruses (B). Elastini, biliaarsete epiteelirakkude markeri CK19 ja veresoonte markeri α SMA signaal tuvastati portaallalas (C). Rakutuomad märgistati DAPIga. Mõõtkava vastab 50 μ m-le.

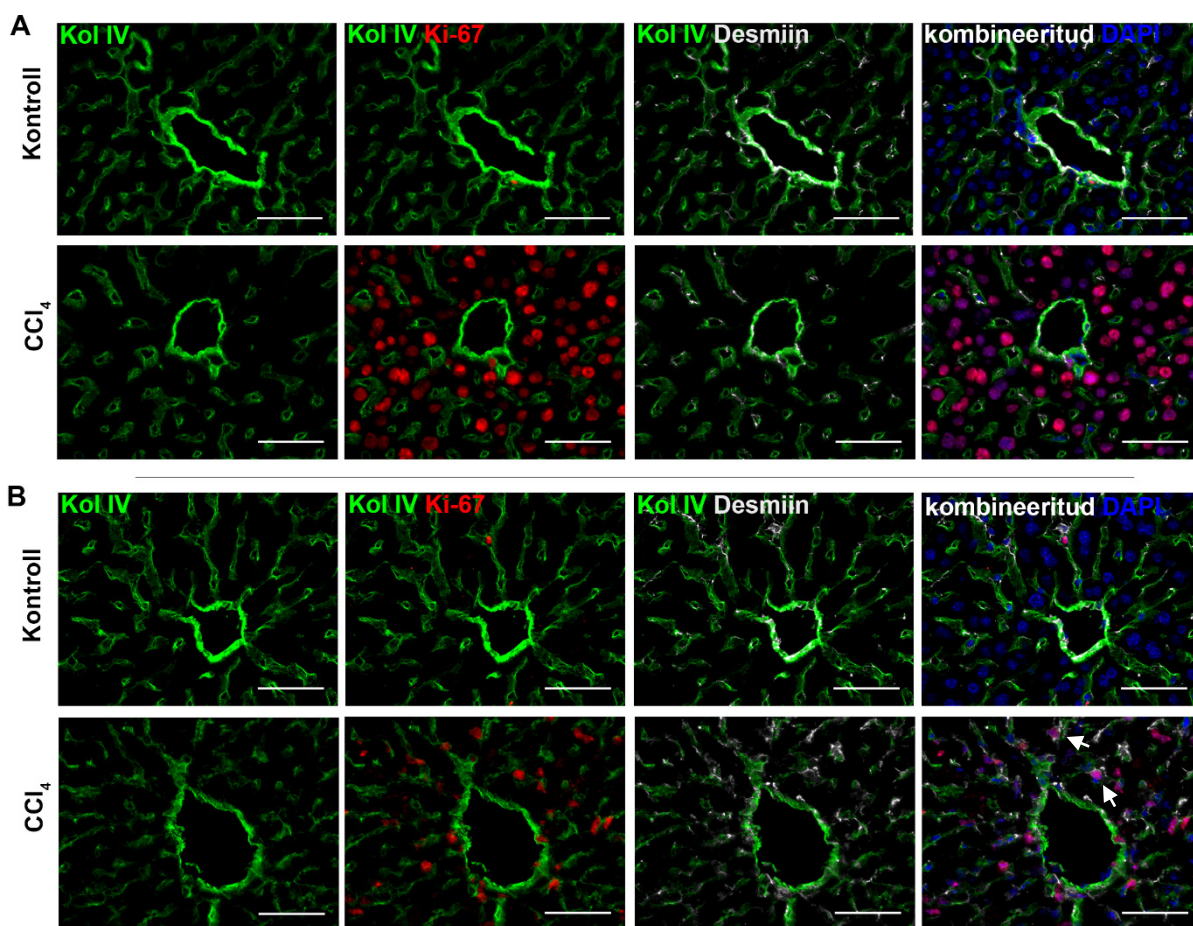
IV tüüpi kollageeni täpsemaks kirjeldamiseks kasutati katsetes IV tüüpi kollageeni, HNF4 α , CK19, desmiini ja Ki-67 vastaseid antikehi (joonised 13 ja 14). Kahjustamata kontrollmaksas esines IV tüüpi kollageen intensiivsemalt suurte veresoonte ümber ja nõrgemalt sinusoidides, kus ekspressioon oli sagariku raames ühesugune. Sinusoidides esines kokkulangevust IV tüüpi

kollageeni ja desmiini sisaldavate tähtrakkude vahel ning sinusoidide vahepeal paiknesid HNF4 α markeriga hepatotsüüdid. Portaalas asuvad CK19 markeriga BECid olid IV tüüpi kollageeniga kohati ümbritsetud ja osaliselt kattuvad. Akuutse maksakahjustuse korral leidis portaalas IV tüüpi kollageeni veresoonte ümber ja sinusoidides. Sarnaselt kontrollile esines osaliselt kattuvust CK19-positiivsete BECidega ja desmiini sisaldavate tähtrakkudega (joonised 13 ja 14). Tsentraalveeni ümbruses oli IV tüüpi kollageeni ekspressioon nõrgem ja hajusam (joonis 14, B).



Joonis 13. IV tüüpi kollageeni ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. Portaalas tuvastati IV tüüpi kollageeni (Kol IV), biliaarsete epiteelirakkude markeri CK19 ja hepatotsüütide markeri HNF4 α signaal. Rakutuomad märgistati DAPIga. Mõõtkava vastab 50 μ m-le.

IV tüüpi kollageeni mõju proliferatiivsusele uuriti, märgistades Ki-67 ekspresseerivad proliferatsioonirakud (joonis 14). Kahjustamata kontrollmaksas leidis üksikuid Ki-67-positiivseid rakke. CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse korral esines tsentraalveeni piirkonnas, kus IV tüüpi kollageeni tase oli alanenud, üksikuid proliferatsioonirakke sinusoidides või nende vahetus läheduses (joonis 14, B). Hulgaliselt proliferatsioonirakke tuvastati portaalas, kus säilis IV tüüpi kollageeni tase (joonis 14, A). Järelikult olid proliferatsioonirakud otseses kokkupuutes IV tüüpi kollageeniga.



Joonis 14. IV tüüpi kollageeni ekspressiooni ja lokalisatsiooni võrdlus kahjustamata kontrollmaksas ja CCl₄-ga kahjustatud maksas, kasutades immunofluorestsentsanalüüsi. IV tüüpi kollageeni (Kol IV), rakkude proliferatiivsusmarkeri Ki-67 ja tähtrakkude markeri desmiini signaal tuvastati portaalas (A) ja tsentraalveeni ümbruses (B). Rakutuumad märgistati DAPIga. Nooled viitavad Ki-67 kolokalisatsioonile desmiiniga (B). Mõõtkava vastab 50 µm-le.

2.4. Arutelu

Käesolevas bakalaureusetöös uuriti akuutse maksakahjustuse põhjustatud muutuseid maksa RVMis. Akuutse maksakahjustuse korral võib toimuda täielik organi funktsiooni taastumine (Stanger, 2015), seega omavad selle käigus toimuvad RVMi muutused olulist rolli regeneratsiooni toetamisel. Katsetes kasutati koeproove hiirtelt, kellele tekitati akuutne maksakahjustus ühekordse CCl₄ doosiga, mis põhjustab peritsentraalsete hepatotsüütide nekroosi, haava paranemise protsessi ja allesjäänud rakkude proliferatsiooni (Starkel ja Leclercq, 2011).

Fibronektiini uurimisel maksas on varem näidatud, et CCl₄ põhjustatud akuutse maksakahjustuse puhul moodustub kahjustunud piirkonnas fibronektiinist ja fibrinogeenist ajutine maatriks (Moriya jt., 2012). Sarnaselt leiti ka käesolevas töös, et kahjustus põhjustab fibronektiini taseme tõusu tsentraalveeni ümbruses. Lisaks lokalisatsioonile sinusoidides esines

hajusamaid fibronektiin-positiivseid alasid (joonis 3), mis võisid tekkida fibronektiini ladestumisel CCl₄ mõjul hävinud hepatotsüütide asemele. Fibronektiin reguleerib rakkude adhesiooni ja migratsiooni (Schwarzbauer ja DeSimone, 2011), mistõttu võib valku sisaldav maatriks soodustada rakkude liikumist kahjustunud piirkonda (Wight ja Potter-Perigo, 2011). *In vitro* katsed selgitamaks välja fibronektiini mõju maksa rakkude proliferatsioonile, on näidanud, et valk soodustab mittehepatotsüütide fraktsiooni jagunemist (Klaas jt., 2016, avaldamisel). Sellele viitab ka tsentraalveeni ümbruses Ki-67-positiivsete tähtrakkude ja hematopoeetiliste rakkude esinemine (joonis 3). Moriya jt näitasid, et pärast akuutset maksakahjustust ei ole fibronektiin otseselt vajalik hepatotsüütide proliferatsiooniks, kuid mõjub neile anti-apoptootiliselt. Seega võib suurenenud fibronektiini tase tsentraalveeni ümber (joonis 3) soodustada hepatotsüütide elumust kahjustusest mõjutatud koes. (Moriya jt., 2012)

CCl₄ põhjustab maksas põletikureaktsiooni aktiveerumist (Starkel ja Leclercq, 2011), mistõttu biglütkaani ekspressioonitaseme tõus võib olla põhjustatud valgu osalemisest selles protsessis (Schaefer jt., 2005). Biglütkaan paikneb kahjustunud maksas portaalala proliferatsioonivahetuse (joonised 5 ja 6) vahetus läheduses (joonis 4, A), kuid käesolevas töös ei uuritud valgu kolokalisatsiooni Ki-67-ga, mistõttu ei saa väita otsest mõju proliferatsioonile. Lisaks esines sarnane hepatotsüütide ja biglütkaani kolokalisatsioon ka kahjustamata kontrollmaksas (joonis 4, A), mistõttu ei pruugi olla seost rakkude jagunemisega.

Vitronektiin reguleerib haava paranemise protsessi (Jang jt., 2000) ja osaleb trombi piirkonda ajutise maatriksi moodustamises (Leavesley jt., 2013; Schäfer ja Werner, 2008). Akuutse maksakahjustuse korral tekkis tsentraalveeni ümbrusesse vitronektiin-positiivne ala (joonised 5, 6 ja 7). Kuna kahjustuse järel toimub selles piirkonnas hepatotsüütide nekroos (Malato jt., 2011), võib vitronektiini ladestumine olla vajalik hävinud rakkude ajutiseks asendamiseks. Varem on näidatud, et vitronektiin võimendab integriinidega seostumise vahendusel rakkude migratsiooni (Stefansson ja Lawrence, 1996). Sellest tulenevalt võib vitronektiinist moodustuv maatriks pakkuda portaalalas paiknevatele proliferatsioonivahetusele hepatotsüütidele (joonis 6, A) migreerumiseks vajaliku pinna ja seeläbi soodustada kahjustuse piirkonnas hävinud rakkude asendamist. Vitronektiini otsesele mõjule rakkude proliferatsioonile viitab Ki-67-positiivsete tähtrakkude (joonis 6, B) ja arvatavasti hematopoeetiliste rakkude (joonis 3, B) esinemine tsentraalveeni ümbruses, kuid see tähelepanek vajab täiendavat kinnitamist. Samuti võib laialdase vitronektiin-positiivse piirkonna teke olla põhjustatud vereplasma vitronektiini võimest seonduda nekrootiliste rakkude tsütoplasma (Stepanek jt., 2011).

Sarnaselt vitronektiinile ei esinenud OLFM4 ekspressiooni kahjustamata kontrollmaksas, kuid OLFM4-positiivne piirkond tuvastati akuutse maksakahjustuse korral tsentraalveeni ümbruses (joonised 9, 10 ja 11). OLFM4 on ülesreguleeritud paljudes kasvajarakkudes, mistõttu on selle rolli rakkude proliferatsiooni mõjutamises uuritud eeskätt neis (Grover jt., 2010). Katsete tulemusel on täheldatud nii kasvajarakkude jagunemise soodustamist (Kobayashi jt., 2007) kui ka OLFM4 mõju mitte avaldumist (Liu jt., 2008). Maksa rakkudega läbiviidud *in vitro* katsed on näidanud, et OLFM4 soodustab hepatotsüütide proliferatsiooni (Klaas jt., 2016, avaldamisel). Käesoleva töö katsed aga ei tuvastatud OLFM4-positiivses piirkonnas Ki-67-antigeeni ekspresseerivaid hepatotsüüte, vaid selles alas prolifereerusid tähtrakud (joonis 10, A) ja hematopoeetilist päritolu rakud (joonis 10, B). Võimalik, et kahjustuse järel soodustab OLFM4 hepatotsüütide proliferatsiooni regeneratsiooni hilisemas faasis, kui portaalas prolifereeruvad hepatotsüüdid (joonised 5 ja 6) on migreerunud tsentraalveeni ümbrusesse, kus toimub hävinud rakkude asendamine (Klaas jt., 2016, avaldamisel). Kasvajarakkudes on tuvastatud, et OLFM4 võib mõjuda rakkudele anti-apoptootiliselt, mistõttu valgu kõrge ekspressioonitase kahjustunud maksas võib olla seotud rakkude elumusega (Zhang jt., 2004).

ARMCX2 on armadillo kordust sisaldav valk (Kurochkin jt., 2001), mille ekspressioon tuvastati kahjustamata kontrollmaksas põhiliselt hepatotsüütide tuumades (joonis 8). Hepatotsüüdid omavad polariseerunud fenotüüpi (Müsch, 2014) ja varem on ARMCX2 ekspressiooni seostatud rakkude polariseeritusega (Kurochkin jt., 2001), mistõttu võib eeldada, et ARMCX2 omab sarnast rolli ka hepatotsüütides. Pärast akuutset maksakahjustust säilis valgu ekspressioon portaalala prolifereeruvates (joonised 5 ja 6; joonis 8, A), kuid puudus kahjustusest mõjutatud hepatotsüütides (joonis 8). ARMCX2 ekspressioon kaob kartsinoomides, mistõttu on viidatud selle rollile normaalse rakutsükli kontrollija ja kasvaja supressorvalguna (Kurochkin jt., 2001). Seega võib ARMCX2 osaleda ka hepatotsüütide rakutsükli kontrollis ja kahjustuse järgse proliferatsiooni reguleerimises. *In vitro* katsed hindamaks ARMCX2 mõju maksa rakkude proliferatsioonile on näidanud, et ARMCX2 soodustab maksas mittehepatotsüütide fraktsiooni jagunemist (Klaas jt., 2016, avaldamisel). Niisiis võib eeldada, et ARMCX2 võib küll kontrollida hepatotsüütide rakutsükli, kuid ei pruugi otseselt soodustada hepatotsüütide proliferatsiooni. Veel leiti, et ARMCX2 ekspresseerub arvatavasti tsentraalveeni ümbritsevates tähtrakkudes (joonis 8, B; joonis 6, B), mis on osa maksa mittehepatotsüütide fraktsioonist, mistõttu on võimalik, et ARMCX2 soodustab tähtrakkude proliferatsiooni. Kuna aga selles töös ei viidud otseselt läbi katseid ARMCX2, desmiini ja Ki-67 vastaste antikehadega, tuleks seda kolokalisatsiooni täiendavalt kinnitada.

Elastiini, mis on kudede elastsuse eest vastutavate elastiinkiidude põhiline komponent (Wise ja Weiss, 2009), muutus veresoonte ümber (joonis 12) ei viidanud rollile maksa parenhüümi taastamises. Kasutades sama akuutse maksakahjustuse mudelit, on aga täheldatud RVMi jäikuse kasvu, mis võib olla põhjustatud elastiini hulga vähenemisest. Mesenhümaalsete tüvirakkudega läbiviidud katsete tulemusel on selgunud, et RVMi jäikus mõjutab rakkude migratsiooni ja proliferatsiooni (Tse ja Engler, 2011), seega võib elastiini taseme alanemine soodustada kaudselt maksa koe taastamises osalevate rakkude migratsiooni ja proliferatsiooni. (Klaas jt., 2016, avaldamisel)

IV tüüpi kollageen esineb maksa veresoonte harude basaalmembraanis (Martinez-Hernandez ja Amenta, 1995) ja sinusoidides (Clement jt., 1986). Sarnane paiknemine tuvastati ka käesolevas töös kahjustamata kontrollmaksas (joonised 13 ja 14). Akuutne maksakahjustus põhjustas valgu ekspressioonitaseme alanemist tsentraalveeni ümbruses (joonis 14, B), kuid tase säilis portaalveeni juures, kus esinesid prolifereeruvad hepatotsüüdid (joonis 14, A). *In vitro* katsed selgitamaks IV tüüpi kollageeni mõju maksa rakkude proliferatsioonile, on tuvastanud valgu võime soodustada hepatotsüütide jagunemist, mistõttu võib portaalalas säiluv IV tüüpi kollageen soodustada lähedal paiknevate hepatotsüütide jagunemist (Klaas jt., 2016, avaldamisel).

Käesolevas töös tuvastatud akuutse maksakahjustuse korral tekkivad muutused maksa RVMi komponentides aitavad paremini mõista maksa RVMi rolli kahjustuse järgses regeneratsioonis. Katsete tulemustel kirjeldatud RVMi komponentide ekspressioonitaseme ja lokalisatsiooni erinevused võivad soodustada kahjustuse järgset rakkude migratsiooni, elumust ja proliferatsiooni. Olenevalt uuritavast komponendist ja selle tuvastatud lokalisatsioonist võib mõju proliferatsioonile olla otsene, põhinedes RVMi komponendi ja prolifereeruvate rakkude kolokalisatsioonil, või kaudne, soodustades kahjustust parandavate rakkude elumust või migratsiooni kahjustuse piirkonda. Kahjustunud tsentraalveeni ümbruses, kus toimub hepatotsüütide nekroos (Malato jt., 2011), prolifereerusid tähttrakud ja hematopoeetilised rakud, mis omavad tähtsat rolli kahjustuse järgses põletikureaktsiooni ja koe ümberkujundamises (Pellicoro jt., 2014). Portaalalas prolifereerusid hepatotsüüdid, mis asendavad kahjustuse piirkonnas hävinud rakke (Malato jt., 2011; Starkel ja Leclercq, 2011). Immunofluorestsentsanalüüsi abil tuvastatud ekspressioonitaseme ja lokalisatsiooni erinevused ei võimalda täpselt kindlaks määrata muutuste funktsiooni ja mehhanismi, mistõttu vajavad saadud tulemused edasist uurimist. Maksa rakke mõjutavate väliskeskkonna signaalide, sh RVMi, mõistmine on tähtis regeneratiivses meditsiinis siirdamiseks kasutatavate rakkude kasvatamisel ja *in vivo* regeneratiivse vastuse stimuleerimisel (Gehart ja Clevers, 2015; Lane jt., 2014).

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli kirjeldada maksa RVMi komponentide muutuseid akuutse maksakahjustuse korral. Uuritavad RVMi komponendid valiti tuginedes töögrupis eelnevalt läbiviidud proteoomika analüüsile, mis tuvastas akuutse maksakahjustuse järel fibronektiini, biglukaani, ARMCX2, OLFM4 ja vitronektiini ekspresioonitaseme tõusu ning elastiini ja IV tüüpi kollageeni languse. Käesoleva töö eesmärgiks oli kirjeldada nimetatud valkude ekspresioonitaseme ja lokalisatsiooni muutuseid maksakoes ning uurida nende mõju kahjustuse järel toimuvale rakkude proliferatsioonile. Eesmärkide saavutamiseks kasutati immunofluorestsentsanalüüsi hiire maksa koelõikudel.

RVMi komponentide ekspresioonitaseme ja lokalisatsiooni uurimisel tuvastati fibronektiini, vitronektiini, biglukaani ja OLFM4 ladestumine kahjustusest mõjutatud tsentraalveeni ümbrusesse. ARMCX2 esines samas piirkonnas arvatavates tähtrakkudes; portaalalas oli valk tuvastatav rakuvälises ruumis ja hepatotsüütide tuumades. IV tüüpi kollageeni tase säilis portaalalas, kuid langes tsentraalveeni ümbruses. Elastiini ekspresioon langes kahjustuse järel mõlemas piirkonnas. Varem läbiviidud uurimused viitavad, et fibronektiini ja vitronektiini ladestumine võib soodustada rakkude migratsiooni kahjustuse piirkonda ning fibronektiini ja OLFM4 esinemine toetada rakkude elumust kahjustunud koes. Elastiini taseme langus võib muuta RVMi jäigemaks, mõjutades kaudselt rakkude migratsiooni ja proliferatsiooni.

Rakkude proliferatsiooni uurimisel tuvastati tsentraalveeni ümbritsevas kahjustunud piirkonnas proliferereervad tähtrakud ja hematopoeetilised rakud ning portaalalas hepatotsüüdid. Seega võib fibronektiin ja vitronektiin soodustada samas piirkonnas esinevate rakkude jagunemist ning ARMCX2 mõjutada tähtrakke. OLFM4 soodustab hepatotsüütide proliferatsiooni, mistõttu võib see omada rolli regeneratsiooni hilisemas faasis, kui portaalalas proliferereervad hepatotsüüdid on migreerunud tsentraalveeni ümbrusesse. Portaalalas võib hepatotsüütide rakutsükli reguleerimises osaleda ARMCX2 ja proliferatsiooni mõjutada IV tüüpi kollageen. Biglukaani otsest mõju proliferatsioonile katsete käigus ei uuritud.

Käesoleva töö tulemused kinnitasid töögrupis eelnevalt tuvastatud RVMi komponentide ekspresioonitaseme muutuseid ja nende lokalisatsioon viitas, et RVMi komponendid võivad kahjustuse järel mõjutada rakkude migratsiooni, elumust ja proliferatsiooni. Saadud tulemused aitavad paremini mõista RVMi rolli maksa regeneratsioonis ja komponentide mõju rakkude proliferatsioonile. Käesolevas töös kasutatud meetodika ei võimalda täpselt kindlaks teha RVMi komponentide muutuste funktsiooni ja mehhanismi, mistõttu vajavad saadud tulemused edasist uurimist.

Characterization of the changes in the extracellular matrix composition during liver damage

Krista Vadi

SUMMARY

Liver is an essential organ for regulating homeostasis, on account of which liver damage causes severe diseases. Following acute injury, liver has an enormous regenerative capability that can lead to total restitution of its function. On the contrary, chronic liver injury is accompanied by continuous inflammatory response and excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) and thereof causes liver disease. Recent studies have discovered that in response to chronic injury, the liver's differentiated cells acquire stem-cell-like properties. For that reason, it is important to investigate changes occurring in their surrounding environment. ECM is a noncellular component of the tissue, that supports the cells and regulates their behavior: proliferation, differentiation, polarity and migration. It has been noted, that ECM is important for effective regeneration, but its precise role is not well understood. Acute liver injury can lead to restitution of the tissue, thereof changes occurring in the ECM can support liver regeneration.

The aim of this study was to characterize the changes of ECM composition during acute liver damage and its impact on cell proliferation. The experiments were conducted by immunofluorescence analysis, which identified changes in the expression and localization of ECM constituents: fibronectin, biglycan, vitronectin, olfactomedin-4 (OLFM4), armadillo repeat-containing X-linked protein 2 (ARMCX2), elastin and type IV collagen.

Following acute liver injury fibronectin, vitronectin, OLFM4 and biglycan accumulated around damaged pericentral areas. ARMCX2 expression was detected around portal areas and in the nuclei of hepatocytes. Type IV collagen was downregulated in damaged areas but was sustained in the periportal region. Elastin was downregulated in both periportal and pericentral areas. Cell proliferation was seen in the damaged pericentral areas, where the main proliferating cells were stellate cells and hematopoietic cells. It's possible that fibronectin and vitronectin are able to regulate their proliferation. Hepatocytes, which mainly proliferate around portal areas, could be stimulated by type IV collagen and their cell cycle regulated by ARMCX2. Following migration to the damaged areas, hepatocytes proliferation could be stimulated by OLFM4.

The results of this study help to better understand ECM's role in liver regeneration and give an overview of constituents that regulate cell proliferation. However, ECM's effect on migration, survival and proliferation and the precise mechanism needs further investigation.

KIRJANDUSE LOETELU

Akhurst, B., Croager, E.J., Farley-Roche, C.A., Ong, J.K., Dumble, M.L., Knight, B., ja Yeoh, G.C. (2001). A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology* 34: 519–522.

Alberts, B. jt. 2015. *Molecular biology of the cell*, p. 1035-1090 Garland Science, New York, USA.

Aloia, L., Mckie, M.A., ja Huch, M. (2016). Cellular plasticity in the adult liver and stomach. *J. Physiol.* n/a – n/a.(vastuvõetud)

Battaller, R., ja Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 115: 209–218.

Bedossa, P., ja Paradis, V. (2003). Liver extracellular matrix in health and disease. *J. Pathol.* 200: 504–515.

Bischof, A.G., Yüksel, D., Mammoto, T., Mammoto, A., Krause, S., ja Ingber, D.E. (2013). Breast cancer normalization induced by embryonic mesenchyme is mediated by extracellular matrix biglycan. *Integr. Biol. (Camb)*. 5: 1045–1056.

Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.C., ja Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 58: 593–608.

Bonnans, C., Chou, J., ja Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 786–801.

Boot-Handford, R.P., ja Tuckwell, D.S. (2003). Fibrillar collagen: The key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *BioEssays* 25: 142–151.

Braet, F., ja Wisse, E. (2002). Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* 1: 1.

Brunt, E.M., Gouw, A.S.H., Hubscher, S.G., Tiniakos, D.G., Bedossa, P., Burt, A.D., Callea, F., Clouston, A.D., Dienes, H.P., Goodman, Z.D., jt. (2014). Pathology of the liver sinusoids. *Histopathology* 64: 907–920.

Chen, W., Rock, J.B., Yearsley, M.M., Ferrell, L.D., ja Frankel, W.L. (2014). Different collagen types show distinct rates of increase from early to late stages of hepatitis C-related liver fibrosis. *Hum. Pathol.* 45: 160–165.

Clement, B., Grimaud, J. a, Champion, J.P., Deugnier, Y., ja Guillouzo, a (1986). Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. *Hepatology* 6: 225–234.

Dorrell, C., Erker, L., Schug, J., Kopp, J.L., Canaday, P.S., Fox, A.J., Smirnova, O., Duncan, A.W., Finegold, M.J., Sander, M., jt. (2011). Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev.* 25: 1193–1203.

Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D., ja Worch, H. (2006). Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* 7: 2388–2393.

Español-Suñer, R., Carpentier, R., Van Hul, N., Legry, V., Achouri, Y., Cordi, S., Jacquemin,

- P., Lemaigre, F., ja Leclercq, I. a. (2012). Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology* 143: 1564–1575.e7.
- Fausto, N., ja Campbell, J.S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* 120: 117–130.
- van der Flier, L.G., Haegebarth, A., Stange, D.E., van de Wetering, M., ja Clevers, H. (2009). OLFM4 Is a Robust Marker for Stem Cells in Human Intestine and Marks a Subset of Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* 137: 15–17.
- Font-Burgada, J., Shalapour, S., Ramaswamy, S., Hsueh, B., Rossell, D., Umemura, A., Taniguchi, K., Nakagawa, H., Valasek, M.A., Ye, L., jt. (2015). Hybrid Periportal Hepatocytes Regenerate the Injured Liver without Giving Rise to Cancer. *Cell* 162: 766–779.
- Forbes, S.J., ja Rosenthal, N. (2014). Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat. Med.* 20: 857–869.
- Frantz, C., Stewart, K.M., ja Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123: 4195–4200.
- Friedman, S.L. (2003). Liver fibrosis – from bench to bedside. *J. Hepatol.* 38: 38–53.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., jt. (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* 43: 34–41.
- Gebhardt, R., ja Matz-Soja, M. (2014). Liver zonation: Novel aspects of its regulation and its impact on homeostasis. *World J. Gastroenterol.* 20: 8491–8504.
- Gehart, H., ja Clevers, H. (2015). Repairing organs: Lessons from intestine and liver. *Trends Genet.* 31: 344–351.
- Geiger, B., ja Yamada, K.M. (2011). Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a005033
- Gordon, M.K., ja Hahn, R.A. (2010). Collagens. *Cell Tissue Res*; 339(1): 247–257.
- Gressner, O.A., Weiskirchen, R., ja Gressner, A.M. (2007). Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp. Hepatol.* 6: 7.
- Grompe, M. (2014). Liver Stem Cells, Where Art Thou? *Cell Stem Cell* 15: 257–258.
- Grover, P.K., Hardingham, J.E., ja Cummins, A.G. (2010). Stem cell marker olfactomedin 4: Critical appraisal of its characteristics and role in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 29: 761–775.
- Guette, C., Valo, I., Vetillard, A., ja Coqueret, O. (2015). Olfactomedin-4 is a candidate biomarker of solid gastric, colorectal, pancreatic, head and neck, and prostate cancers. *Proteomics - Clin. Appl.* 9: 58–63.
- Hahn, E., Wick, G., Pancev, D., ja Timpl, R. (1980). Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 21: 63–71.
- Halper, J. (2014). Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 77–94.

- Hellerbrand, C. (2013). Hepatic stellate cells-the pericytes in the liver. *Eur. J. Physiol.* 465: 775–778.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., ja Weis, W.I. (1997). Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin. *90*: 871–882.
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., Es, J.H. Van, Wetering, M. Van De, Li, V.S.W., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., Haft, A., jt. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature.* 494(7436): 247–250.
- Van Hul, N.K.M., Abarca-Quinones, J., Sempoux, C., Horsmans, Y., ja Leclercq, I.A. (2009). Relation between liver progenitor cell expansion and extracellular matrix deposition in a CDE-induced murine model of chronic liver injury. *Hepatology* 49: 1625–1635.
- Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., ja Schwartz, M.A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 802–812.
- Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326: 1216–1219.
- Hynes, R.O., Naba, A., Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., Huttenlocher, A., Horwitz, A.R., Geiger, B., Yamada, K.M., Adams, J.C., jt. (2012). Overview of the Matrisome — An Inventory of. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*
- Iozzo, R. V., ja Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 42: 11–55.
- Iseki, H., Takeda, A., Andoh, T., Kuwabara, K., Takahashi, N., Kurochkin, I. V., Ishida, H., Okazaki, Y., ja Koyama, I. (2012). ALEX1 suppresses colony formation ability of human colorectal carcinoma cell lines. *Cancer Sci.* 103: 1267–1271.
- Itoh, T., ja Miyajima, A. (2014). Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology* 59: 1617–1626.
- Jang, Y.C., Tsou, R., Gibran, N.S., ja Isik, F.F. (2000). Vitronectin deficiency is associated with increased wound fibrinolysis and decreased microvascular angiogenesis in mice. *Surgery* 127: 696–704.
- Kallis, Y.N., Robson, A.J., Fallowfield, J. a, Thomas, H.C., Alison, M.R., Wright, N. a, Goldin, R.D., Iredale, J.P., ja Forbes, S.J. (2011). Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response. *Gut* 60: 525–533.
- Karnik, S.K. (2003). A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* 130: 411–423.
- Katoonizadeh, A., Poustchi, H. (2014). Adult Hepatic Progenitor Cell Niche : How it affects the Progenitor Cell Fate Adult Hepatic Progenitor Cell Niche : How it affects the Progenitor Cell Fate. *Middle East J. Dig. Dis.* 6.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V., ja Hudson, B.G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc. Res. Tech.* 71: 357–370.
- Kielty, C.M. (2006). Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* 8: 1–23.
- Klaas, M. jt. (2016) The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. *Sci. Rep.* 6, 27398.

- Kobayashi, D., Koshida, S., Moriai, R., Tsuji, N., ja Watanabe, N. (2007). Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells. *Cancer Sci.* 98: 334–340.
- Kopp, J.L., Grompe, M., ja Sander, M. (2016). Stem cells versus plasticity in liver and pancreas regeneration. *Nat. Cell Biol.* 18: 238–245.
- Kurochkin, I. V., Yonemitsu, N., Funahashi, S.I., ja Nomura, H. (2001). ALEX1, a novel human armadillo repeat protein that is expressed differentially in normal tissues and carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 340–347.
- Lane, S.W., Williams, D. a, ja Watt, F.M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat. Biotechnol.* 32: 795–803.
- Leavesley, D.I., Kashyap, A.S., Croll, T., Sivaramakrishnan, M., Shokoohmand, A., Hollier, B.G., ja Upton, Z. (2013). Vitronectin-master controller or micromanager? *IUBMB Life* 65: 807–818.
- LeBleu, V.S., Macdonald, B., ja Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med* 232: 1121–1129.
- Lepp, A. 2013. Inimese anatoomia. p. 362-365. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu, Eesti.
- Li, D.Y., Brooke, B., Davis, E.C., Mecham, R.P., Sorensen, L.K., Boak, B.B., Eichwald, E., ja Keating, M.T. (1998). Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature* 393: 276–280.
- Liedtke, C., Luedde, T., Sauerbruch, T., Scholten, D., Streetz, K., Tacke, F., Tolba, R., Trautwein, C., Trebicka, J., ja Weiskirchen, R. (2013). Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* 6: 19.
- Liu, W., Chen, L., Zhu, J., ja Rodgers, G.P. (2006). The glycoprotein hGC-1 binds to cadherin and lectins. *Exp. Cell Res.* 312: 1785–1797.
- Liu, W., Liu, Y., Zhu, J., Wright, E., Ding, I., ja Rodgers, G.P. (2008). Reduced hGC-1 protein expression is associated with malignant progression of colon carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 14: 1041–1049.
- Liu, Y., Meyer, C., Xu, C., Weng, H., Hellerbrand, C., ten Dijke, P., ja Dooley, S. (2013). Animal models of chronic liver diseases. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304: G449–G468.
- Lorenzini, S., Bird, T.G., Boulter, L., Bellamy, C., Samuel, K., Aucott, R., Clayton, E., Andreone, P., Bernardi, M., Golding, M., jt. (2010). Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut* 59: 645–654.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., ja Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1–24.
- Machado, M.V., ja Diehl, A.M. (2014). Liver renewal: Detecting misrepair and optimizing regeneration. *Mayo Clin. Proc.* 89: 120–130.
- Mahadevan V, *Anatomy of the liver, Surgery* (2014)

- Malarkey, D.E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G., ja Maronpot, R.R. (2005). New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol. Pathol.* 33: 27–34.
- Malato, Y., Naqvi, S., Schürmann, N., Ng, R., Wang, B., Zape, J., Kay, M. a., Grimm, D., ja Willenbring, H. (2011). Fate tracing of mature hepatocytes in mouse liver homeostasis and regeneration. *J. Clin. Invest.* 121: 4850–4860.
- Martinez-Hernandez, A., ja Amenta, P.S. (1995). The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 9: 1401–1410.
- McEwan, P.A., Scott, P.G., Bishop, P.N., ja Bella, J. (2006). Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J. Struct. Biol.* 155: 294–305.
- Mederacke, I., Hsu, C.C., Troeger, J.S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D.H., Pradere, J.-P., ja Schwabe, R.F. (2013). Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat. Commun.* 4: 2823.
- Mitra, V., ja Metcalf, J. (2009). Metabolic functions of the liver. *Anaesth. Intensive Care Med.* 10: 334–335.
- Mitra, V., ja Metcalf, J. (2012). Functional anatomy and blood supply of the liver. *Anaesth. Intensive Care Med.* 13: 52–53.
- Miyajima, A., Tanaka, M., ja Itoh, T. (2014). Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell* 14: 561–574.
- Miyaoka, Y., Ebato, K., Kato, H., Arakawa, S., Shimizu, S., ja Miyajima, A. (2012). Hypertrophy and Unconventional Cell Division of Hepatocytes Underlie Liver Regeneration. *Curr. Biol.* 22: 1166–1175.
- Moreth, K., Iozzo, R. V., ja Schaefer, L. (2012). Small leucine-rich proteoglycans orchestrate receptor crosstalk during inflammation. *Cell Cycle* 11: 2084–2091.
- Moriya, K., Sakai, K., Yan, M.H., ja Sakai, T. (2012). Fibronectin is essential for survival but is dispensable for proliferation of hepatocytes in acute liver injury in mice. *Hepatology* 56: 311–321.
- Mouw, J.K., Ou, G., ja Weaver, V.M. (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15: 771–785.
- Müsch, A. (2014). The unique polarity phenotype of hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 328: 276–283.
- Neubauer, K., Saile, B., ja Ramadori, G. (2001). Liver fibrosis and altered matrix synthesis. *Can. J. Gastroenterol.* 15: 187–193.
- Pankov, R., ja Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115: 3861–3863.
- Pellicoro, A., Aucott, R.L., Ramachandran, P., Robson, A.J., Fallowfield, J.A., Snowdon, V.K., Hartland, S.N., Vernon, M., Duffield, J.S., Benyon, R.C., jt. (2012). Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology* 55: 1965–1975.
- Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., ja Fallowfield, J. a (2014). Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 181–194.
- Perera, M.T.P.R., Mirza, D.F., ja Elias, E. (2009). Liver transplantation: Issues for the next 20 years. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24 Suppl 3: S124–S131.

- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., ja Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131: 1619–1628.
- Racanelli, V., ja Rehmann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43.
- Reinboth, B., Hanssen, E., Cleary, E.G., ja Gibson, M.A. (2002). Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: Biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J. Biol. Chem.* 277: 3950–3957.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: 1–19.
- Rodrigo-Torres, D., Affò, S., Coll, M., Morales-Ibanez, O., Millán, C., Blaya, D., Alvarez-Guaita, A., Rentero, C., Lozano, J.J., Maestro, M.A., jt. (2014). The biliary epithelium gives rise to liver progenitor cells. *Hepatology* 1367–1377.
- Rozario, T., ja DeSimone, D.W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* 341: 126–140.
- Schaefer, L., Babelova, A., Kiss, E., Hausser, H.J., Baliova, M., Krzyzankova, M., Marsche, G., Young, M.F., Mihalik, D., Götte, M., jt. (2005). The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J. Clin. Invest.* 115: 2223–2233.
- Schäfer, M., ja Werner, S. (2008). Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 628–638.
- Schaub, J.R., Malato, Y., Gormond, C., ja Willenbring, H. (2014). Evidence against a Stem Cell Origin of New Hepatocytes in a Common Mouse Model of Chronic Liver Injury. *Cell Rep.* 8: 933–939.
- Schuppan, D., ja Afdhal, N.H. (2008). Liver cirrhosis. *Lancet* 371: 838–851.
- Schwartz, I., Seger, D., ja Shaltiel, S. (1999). Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 539–544.
- Schwarzbauer, J.E., ja DeSimone, D.W. (2011). Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: 1–19.
- Shin, S., Walton, G., Aoki, R., Brondell, K., Schug, J., Fox, A., Smirnova, O., Dorrell, C., Erker, L., Chu, A.S., jt. (2011). Foxl1-Cre-marked adult hepatic progenitors have clonogenic and bilineage differentiation potential. *Genes Dev.* 25: 1185–1192.
- Singh, P., Carraher, C., ja Schwarzbauer, J. (2012). Assembly of Fibronectin Extracellular Matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2010. 26:397–419
- Si-Tayeb, K., Lemaigre, F.P., ja Duncan, S. a. (2010). Organogenesis and Development of the Liver. *Dev. Cell* 18: 175–189.
- Smith, C.A., McClive, P.J., ja Sinclair, A.H. (2005). Temporal and spatial expression profile of the novel armadillo-related gene, Alex2, during testicular differentiation in the mouse embryo. *Dev. Dyn.* 233: 188–193.
- Stanger, B.Z. (2015). Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver. *Annu. Rev. Physiol.* 77: 179–200.
- Starkel, P., ja Leclercq, I. a (2011). Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract.*

Res. Clin. Gastroenterol. 25: 319–333.

Stefansson, S., ja Lawrence, D. a (1996). The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature* 383: 441–443.

Stepanek, O., Brdicka, T., Angelisova, P., Horvath, O., Spicka, J., Stockbauer, P., Man, P., ja Horejsi, V. (2011). Interaction of late apoptotic and necrotic cells with Vitronectin. *PLoS One* 6(5) e19243.

Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N., ja Miyajima, A. (2011). Liver stem/progenitor cells: Their characteristics and regulatory mechanisms. *J. Biochem.* 149: 231–239.

Tanimizu, N., ja Mitaka, T. (2014). Re-evaluation of liver stem/progenitor cells. *Organogenesis* 10: 208–215.

Tarlow, B.D., Finegold, M.J., ja Grompe, M. (2014a). Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology* 60: 278–289.

Tarlow, B.D., Pelz, C., Naugler, W.E., Wakefield, L., Wilson, E.M., Finegold, M.J., ja Grompe, M. (2014b). Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell* 15: 605–618.

Taub, R. (2004). Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 836–847.

Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C., ja Karamanos, N.K. (2015). Extracellular matrix structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97: 4–27.

Tse, J.R., ja Engler, A.J. (2011). Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One* 6(1): e15978.

VanDussen, K.L., Carulli, a. J., Keeley, T.M., Patel, S.R., Puthoff, B.J., Magness, S.T., Tran, I.T., Maillard, I., Siebel, C., Kolterud, a., jt. (2012). Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development* 139: 488–497.

Wang, B., Zhao, L., Fish, M., Logan, C.Y., ja Nusse, R. (2015). Self-renewing diploid Axin2+ cells fuel homeostatic renewal of the liver. *Nature*. 525.180-185.

Wight, T.N., ja Potter-Perigo, S. (2011). The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 301: G950–G955.

Williams, M.J., Clouston, A.D., ja Forbes, S.J. (2014). Links between hepatic fibrosis, ductular reaction, and progenitor cell expansion. *Gastroenterology* 146: 349–356.

Wise, S.G., ja Weiss, A.S. (2009). Tropoelastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 494–497.

Yanger, K., ja Stanger, B.Z. (2011). Facultative stem cells in liver and pancreas: fact and fancy. *Dev. Dyn.* 240: 521–529.

Yanger, K., Zong, Y., Maggs, L.R., Shapira, S.N., Maddipati, R., Aiello, N.M., Thung, S.N., Wells, R.G., Greenbaum, L.E., ja Stanger, B.Z. (2013). Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev.* 27: 719–724.

Yanger, K., Knigin, D., Zong, Y., Maggs, L., Gu, G., Akiyama, H., Pikarsky, E., ja Stanger, B.Z. (2014). Adult Hepatocytes Are Generated by Self-Duplication Rather than Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell* 15: 340–349.

- Yurchenco, P.D. (2011). Basement membranes: Cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: 1–27.
- Zajicek, G., Oren, R., ja Weinreb, M. (1985). The streaming liver. *Liver* 5: 293–300.
- Zhang, X., Huang, Q., Yang, Z., Li, Y., ja Li, C. (2004). GW112 , A Novel Antiapoptotic Protein That Promotes Tumor Growth. *Cancer Res.* 64:2474–2481.
- Zhou, A., Huntington, J. a, Pannu, N.S., Carrell, R.W., ja Read, R.J. (2003). How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat. Struct. Biol.* 10: 541–544.

TÄNUAVALDUSED

Ma sooviksin tänada oma juhendajaid Mariliis Klaasi ja Viljar Jaksi nende kannatlikkuse, nõu ja abivalmiduse eest.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Krista Vadi

(sünnikuupäev: 28.10.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Maksa rakuvälise maatriksi komponentide muutuste iseloomustamine maksakahjustuse korral“,

mille juhendajad on Mariliis Klaas ja Viljar Jaks

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016

LISAD

LISA 1. Artikkel: „The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue.“

Artikli väljaandja tingimuste kohaselt ei ole võimalik käesoleva bakalaureusetöö veebivariandis artiklit avaldada.

Artikli viide: Klaas, M. jt. The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue. Sci. Rep. 6, 27398; doi: 10.1038/srep27398 (2016).

LISA 2. Loomkatseprojekti luba nr 25



PÕLLUMAJANDUSMINISTEERIUM

LOOMKATSEPROJEKTI LOAKOMISJON

OTSUS
Tallinnas

17. veebruar 2014 nr 25

Loomkatseprojekti luba

Loomakaitseaduse § 45 lõike 2 alusel ning loomkatseprojekti loakomisjoni 17. veebruari 2014. a istungi protokoll nr 10 kohaselt otsustati järgmist:

1. Anda luba **Viljar Jaks'ile** (sünd. 05.12.1967, aadress: Riia 23, Tartu, 51010) loomkatseprojekti: „**Maksa tüvirakkude roll ja regulatsioon maksa regeneratsioonis ning maksakasvajate tekkel**“ läbiviimiseks järgmistel tingimustel:

1.1. loomkatseprojekti kavandaja ja loomkatseprojekti eest vastutav isik Viljar Jaks (sünd. 05.12.1967, aadress: Riia 23, Tartu, 51010);

1.2. loomkatseprojekti läbiviimise aeg ja koht: 01.03.2014 - 28.02.2017, Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudi vivaarium, KL1202, aadress: Riia 23, Tartu, 51010;

1.3. loomkatseprojekti kaasatud isikud: **Kristiina Mäemets-Allas** (sünd. 31.01.1977);

1.4. katseloomade liik ja arv: 204 hiirt

1. Aasta

Kokku 1. aastal 78 Rosa26-rtTA/TRE-hiirt ning 18 Nu/Nu BalbC hiirt.

2. Aasta

Erinevate maksa rakuliste komponentide osa selgitamine regeneratsioonis vajaks 3 CreERT liini puhul 3 katsepunkti iga kahjustuse meetodi kohta. Kontrollina kasutatakse kahjustamata hiiri. Seega kasutatavate hiirte arv selles katses on 54. (3 Cre liini x 3 katsepunkti x (3 maksakahjustusega hiirt + 3 kontrollhiirt))

3. Aasta

Lgr5-ekspresserivate rakkude päritolu kindlakstegemine nõuab 2 CreERT liini kasutamist 3 maksakahjustuse meetodi puhul. Kuna ka siin on oluline kontrollide

lisamine siis vajatakse samuti 54 hiirt (2 Cre liini x 3 katsepunkti x 3 maksakahjustusega hiirt x 3 kontrollhiirt))

1.5. loomkatses rakendatavad menetlused:

1. Loomkatsete käigus tekitatakse hiirte maksas maksakahjustus järgmistel viisidel:

a) CCl₄ (süsiniktetrakloriid 1,25mg/kg) intraperitoneaalne (i.p.) injektsioon lahustatuna taimeõlis tekitab keskmise astmega maksakahjustus, mis paraneb ca 7 päeva jooksul. Tegemist on 24h jooksul mööduva keskmise astme valu/kannatusega. Valu vähendamiseks süstitakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas. Juhul kui hiirel tekivad tugeva kannatuse sümptomid või peritoneaalärritusnähud hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

b) DDC (3,5-diethoksükarbonüül-1,4-dihüdrokollidiin) dieet (100mg/ toidu kg kohta) 7 päeva põhjustab keskmise kahjustuse, mis paraneb 1 nädalaga. Kuna valu põhjus on maksa pais/turse siis valuvaigistite manustamine ei anna soovitud efekti. Juhul kui hiirel tekivad tugeva kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

c) osaline maksaresektatsioon üldanesteesias (hypnorm/dormicumi vesilahuse - fentanüülsitraat 0,079 mg/ml; fluanision 2,5 mg/ml ja midasolaam 1,25 mg/ml intraperitoneaalne süst, 0,05 - 0,1 ml/10g, anesteesia kestus ca 60 min). Kõhuõõs avatakse ning vasak sagar eemaldatakse (30% maksast) ja kõhuõõs suletakse. Kuna tegemist on tugeva valuga manustatakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas 4 postoperatiivse päeva jooksul. Juhul kui valu sümptomid püsivad jätkatakse valuvaigisti manustamist. Maks regenereerub 2 nädalaga. Hiired hukatakse 2 nädala möödumisel peale protseduuri. Kui hiir ei taastu 24h jooksul või tekivad kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 45 hiirel.

2. CreERT rekombinaasi aktiveerimiseks süstitakse hiiri tamoksifeeni lahusega taimeõlis 1-10mg/hiire kohta 1-2 korda i.p. Tegemist on väga lühiajalist ebamugavustunnet, kerget valu ja stressi põhjustava protseduuriga. Sel juhul hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 135 hiirel.

3. Spontaansete maksakasvajate tekitamine ühekordse dietüülnitroosamiini (DEN) õlilahuse süstiga (i.p. 25mg/kg kuni 4x üle päeva, 21 päeva vanustele hiirtele) ning pideva fenobarbitaali manustamisega joogivees (0,05%). Kasvajate arengut jälgitakse 40 nädala jooksul. DEN süstid põhjustavad lühiajalist ebamugavust (vt punkt 2). Fenobarbitaali manustamine ei tekita mingeid vaevusi. Maksakasvajate teke on üldiselt valu, kuid võivad esineda tõsised tüsistused (pais ja sellest astsiit, valusündroom), mis väljenduvad hiirte apaatsuses, sundasendis, kaalulanguses üle 20%). Nende sümptomite ilmnemisel hiired hukatakse kohe. Kergema valu sümptomite ilmnemisel manustatakse valuvaigistit (Rimadyl 5mg/kg s.c.) 1x päevas. Protseduur viiakse läbi 39 hiirel.

5. Tetratsükliinsõltuva transkriptsiooni aktiveerimiseks manustatakse hiirtele doksütsükliini (2 g/l) joogivees, millele on lisatud 5% sahharoosi. Ka pikaajaline doksütsükliini manustamine ei oma mingeid negatiivseid mõjusid ei hiirte arengule, elukvaliteedile ega viljakusele. Protseduur viiakse läbi 78 hiirel.

6. Maksarakkude transplantatsiooniks, kõhuõõs avatakse üldanesteesias ja sorditud rakud süstitakse maksa vasakusse sagarasse kasutades insuliinisüstalt (G30). Kõhuõõs suletakse, haav kaetakse ning hiirele manustatakse valuvaigistit subkutaanselt. Hiirt jälgitakse 2x päevas 3 postoperatiivse päeva jooksul. Valuvaigistit manustatakse nagu

punktis 1a 3 postop päeva jooksul 1x päevas. Kui hiir ei taastu 24h jooksul või tekivad kannatuse sümptomid hiir hukatakse. Protseduur viiakse läbi 18 hiirel.

Humaansete lõpp-punktide üldised kriteeriumid: Katsed lõpetatakse enne planeeritud katse lõppu hiirte üldseisundi halvenemisel (esinevad kannatussümptomid: spetsiifiline sundasend, loidus, toidust keeldumine); kaalulangusel üle 20%, kui tekib astsiit või kui operatsioonide korral loom ei ole 2. postoperatiivse päeva lõpuks taastunud (loom on loid, sundasendis).

Loomade hukkamise metoodika: Loomad hukatakse tservikaalse dislokatsiooni teel katse lõppemisel või ülalpool defineeritud humaansete lõpp-punktide saabumisel. Ühtegi katselooma ei kasutata katsetes korduvalt. Loomadel läbi viidavate katsete üksikasjaline kirjeldus on toodud punktis 1.

2. Otsust on õigus vaidlustada haldusmenetluse seaduses või halduskohtumenetluse seadustikus ettenähtud korras ja tähtaja jooksul.

Mario Plaas

/allkirjastatud digitaalselt/

Komisjoni esimees